

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**



**FACULTAD DE  
CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES FENOTÍPICOS Y MUTANTES  
DE *Pseudomonas fluorescens* F113: COLONIZACIÓN DE LA  
RIZOSFERA, FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS, MOVILIDAD Y  
BIOCONTROL**

**EMMA BARAHONA MARTÍN**

**Madrid, 2011**





**Memoria presentada por la licenciada en Biología**  
**Emma Barahona Martín para optar al Título de Doctor**

Madrid, Junio de 2011

Fdo. Emma Barahona Martín

**Los directores**

Fdo. Dra. Marta Martín Basanta

Profesor Titular

Dpto. de Biología

Universidad Autónoma de Madrid

Fdo. Dr. Rafael Rivilla Palma

Profesor Titular

Dpto. de Biología

Universidad Autónoma de Madrid



***A mis padres, Paquita y Gonzalo.***

***A mis abuelos y yayos.***



## AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis, Rafa y Marta, por haberme permitido realizar este trabajo en su grupo de investigación y por contribuir a mi formación como investigadora. A Alfonso Bonilla, porque también gracias a su ayuda se ha llevado a cabo este trabajo.

Por supuesto, a mi amiga y futura doctora Ana Navazo. Ya nos hemos dicho muchas cosas, pero por si acaso, sabes que este trabajo es fruto de nuestro esfuerzo común, de nuestra persistencia y ganas por aprender y conseguir hacer las cosas bien. No olvides que estos años nos han aportado muchas cosas que nos servirán en el futuro. A mi amigo Fran, por todo lo que me has enseñado. Gracias por transmitirnos tus conocimientos, apoyo, consejos y sobre todo, gracias por volver y cuidar de nosotras. Espero que os guste como ha quedado nuestro trabajo.

A mis amigos y compañeros de grupo que ya no están aquí. A Dani, por molestarme tanto y meterse tanto conmigo, aunque en el fondo sé que me apreciaba. A Roke, que he tenido la suerte de tenerte en lo científico, político y personal. Gracias por tus buenos consejos que me han hecho pensar tanto por las noches. También a las nuevas incorporaciones, Irene e Isidro, que se "suben" a tomar las cervezas con los viejos y me hacen pasar buenos ratos. Mucho ánimo a los dos con vuestros trabajos ¡valéis mucho!

A María Reguera, jefa de "rizosfera junior" ¡cuántos momentos en el laboratorio, en congresos y de fiesta! Sabes que fui la más perjudicada cuando te fuiste. Tengo que agradecerte enormemente tu apoyo, sobre todo en los momentos duros y tu ayuda que nos ha permitido completar muchos trabajos ahora publicados. A Juan, "el jefecillo". Gracias por aguantar mis charlas, por acogernos tan bien cuando bajamos, por ser nuestro amigo manchego, por dejarte engañar para "meterte" en política, por enseñarme centrar mis pensamientos en lo que importa y por supuesto, gracias por tus consejos con el manuscrito y por la ayuda con la imágenes que tan bien han quedado. Gracias a los dos por ser mis amigos.

A toda la gente de "Fisio Vegetal" con la que compartido experiencias durante estos cinco años. En especial a Paco y Paqui, por estar siempre dispuestos a echar una mano "a las niñas", a Arse, por ayudarnos con las técnicas "complicadas", a Luis Bolaños, por darme ánimos, complicidad y muy buenos consejos, a Javi Lloret, porque he aprendido mucho de él, y por sus historias interminables..., a Mari Perri, por tu forma de ser que tanto me ha hecho reír (muchos días nos acordamos de ti), a Celia Vicente, de la que he aprendido a no dar nada por perdido; y a mis compañeros de docencia, con los que he compartido horas

y horas en los laboratorios de prácticas y que me han iniciado en esta faceta: Paquita, Paqui, Arse, Flor, Eduardo Fernández, Eva, Ángel, Roke y Cris.

A las personas que han pasado fugazmente por aquí, pero que me lo han hecho pasar muy bien: Isa, Julia, Paola y en especial a Paco. Gracias compadre, por deleitarnos con tus "grupos musicales", por hacerme reír tanto y por tus ánimos estos meses.

A la gente del IFAPA de Málaga, que tan bien me acogieron durante mi estancia y en especial al grupo de fitopatología: Rosa, Tere, Josefa, Rocío, Paquita y Angeles. Hubo mucho trabajo y siempre agradeceré vuestra ayuda con los experimentos. A Fátima Yousef, que en Granada nos ayudó con los experimentos de *biofilm* de flujo continuo.

A la gente de los Servicios de Microscopía de la UAM, porque también han aportado en este trabajo: Esperanza, Paco y Cova.

A Candi y Rosi, por darnos ánimos a los que trabajamos aquí y por tener todo siempre apto para que podamos trabajar.

A mis amigos de Ayllón: Clara, Laura (Tusa, qué decir!), Jorge, Natalia, Rober, Javi, Carlos, Félix, Alicia, Jose, Raquel, Roberto... y a toda la gente del Puntazo! Por los buenos momentos que hemos pasado juntos y por los que pasaremos. Siempre nos quedará San Miguel!

A Carlos, por estar a mi lado tanto tiempo, por escucharme, entenderme, aguantarme, cuidarme, apoyarme, por ser mi compañero y mejor amigo, y por un millón de cosas más (como ser el mejor informático!). Gracias.

A mi gran familia. A todos mis abuelos, que me han cuidado mucho. A mis padres, los mejores del mundo, por no hacerme nunca perder la esperanza en este camino tan duro que es la ciencia, por estar siempre a mi lado y por creer en mí y en mis capacidades. A mis hermanos, Natalia y Roberto, por eso, por ser mis HERMANOS. A mis tíos y primos, por interesarse por mi trabajo. A mis cuñados Javi y Raquel, que son también mis hermanos. Y por supuesto, a mis sobrinos Víctor y Marcos, que sin ser conscientes de ello, me han hecho salir adelante en momentos difíciles de mi vida.

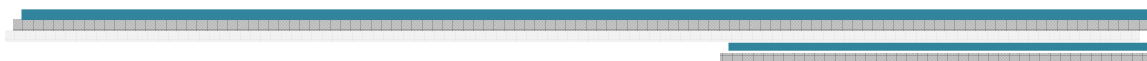
Y aunque parezca raro, doy las gracias al deporte, ya que sin él no podría haber llegado a este momento de mi vida. Gracias a Albéitar.







## ***ÍNDICE***





# ÍNDICE

ABREVIATURAS	xix
--------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	xxi
----------------------------	-----

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1. ECOSISTEMAS TERRESTRES Y AGRÍCOLAS	3
2. SUELO Y SUELO RIZÓSFERICO	4
3. RIZOSFERA	5
3.1. ¿Quién vive en la rizosfera?	8
4. INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO	8
4.1. Interacciones no beneficiosas	9
4.2. Interacciones beneficiosas	9
4.2.1. Interacción planta-hongos simbiotes	10
4.2.2. Interacción planta-hongos de vida libre	11
4.2.3. Interacción planta-PGPR	12
4.2.3.1. PGPRs como biofertilizantes	13
4.2.3.2. PGPRs como fitoestimulantes	13
4.2.3.3. PGPRs como agentes de rizorremediación	14
4.2.3.4. PGPRs como agentes de biocontrol	15
Producción de antibióticos	16
Competencia por espacio y nutrientes	17
Resistencia sistémica inducida	19
5. PSEUDOMONAS Y <i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	22
6. COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA	23
6.1. Colonización de la rizosfera por <i>Pseudomonas</i>	25

6.2. Factores y genes implicados en la colonización de la rizosfera	26
6.2.1. Quimiotaxis y Movilidad	28
6.2.2. Metabolismo de exudados y auxotrofía	31
6.2.3. Lipopolisacáridos e integridad de membrana	32
6.2.4. Adhesión	32
6.2.5. Variación de fase	35
 7. MOVILIDAD BACTERIANA DEPENDIENTE DE FLAGELOS Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS. METABOLISMO DEL di-GMPc EN LA CÉLULA	36
7.1. Movilidad dependiente de flagelos	36
7.1.1. Síntesis y regulación del aparato flagelar	38
7.2. Biopelículas	40
7.2.1. Formación de biopelículas	41
7.3. di-GMPc	45
7.3.1. El di-GMPc y los fenotipos en la célula bacteriana	47
 BIBLIOGRAFÍA	50
 OBJETIVOS	75
 <b>CAPÍTULO 2: Mutantes de <i>Pseudomonas fluorescens</i> F113 afectados en la formación de biopelículas en superficies abióticas colonizan eficientemente la rizosfera</b>	
 RESUMEN	79
 INTRODUCCIÓN	80
 MATERIALES Y MÉTODOS	81
Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento	81
Ensayos de movilidad tipo <i>swimming</i>	82
Ensayos de formación de biopelículas en placas multipocillo	83
Ensayos de formación de biopelículas en sistemas de flujo continuo	83
Ensayos de colonización y colonización competitiva de la rizosfera	84
Microscopía de fluorescencia	85
Microscopía electrónica de barrido	86

<b>RESULTADOS</b>	<b>87</b>
Formación de biopelículas por mutantes hipermóviles y variantes fenotípicos	87
Colonización y colonización competitiva de la rizosfera	90
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>94</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>98</b>
<b>CAPÍTULO 3: Un mutante de <i>Pseudomonas fluorescens</i> F113 más competitivo, presenta mejorada su capacidad de biocontrol de hongos patógenos de raíz</b>	
<b>RESUMEN</b>	<b>105</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>106</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>107</b>
Microorganismos, plásmidos y condiciones de crecimiento	107
Ensayos fisiológicos y enzimáticos	109
Construcción y análisis de mutantes	110
Ensayos de colonización competitiva de la rizosfera	110
Ensayos de biocontrol	111
Sistema <i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>Lycopersici</i> (FOL)/ <i>Lycopersicum esculentum</i> (tomate)	111
Sistema <i>Phytophthora cactorum</i> (Pc)/ <i>Fragaria vesca</i> (fresa)	112
<b>RESULTADOS</b>	<b>113</b>
Análisis fenotípico de los mutantes <i>kinB</i>	113
Análisis de biocontrol en plantas de tomate	117
Análisis de biocontrol en plantas de fresa	119
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>121</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>124</b>

**CAPÍTULO 4: *Pseudomonas fluorescens* F113 produce un segundo aparato flagelar que es importante para la colonización de la rizosfera**

<b>RESUMEN</b>	<b>131</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>132</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>134</b>
Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento	134
Ensayos de movilidad tipo <i>swimming</i>	136
Construcción de mutantes simples y dobles. Ensayos de sobreexpresión	136
Microscopía electrónica de transmisión	137
Extracción, purificación y cuantificación de ARN	137
Síntesis de ADNc y PCR cuantitativa (q-PCR)	138
Extracción de proteínas y <i>Western blot</i>	139
Ensayos de colonización competitiva de la rizosfera	140
<b>RESULTADOS</b>	<b>140</b>
El genoma de <i>P. fluorescens</i> F113 codifica un segundo aparato flagelar	140
Los genes que sintetizan el segundo flagelo no se expresan en <i>P. fluorescens</i> F113, pero sí se expresan en un mutante <i>kinB</i>	142
La expresión ectópica de <i>flhDC</i> incrementa la movilidad en <i>P. fluorescens</i> F113	143
Vfr regula positivamente a <i>flhDC</i>	145
La producción del segundo aparato flagelar genera células bacterianas con hiperflagelación polar	146
La producción del segundo aparato flagelar es importante para la colonización de la rizosfera	148
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>150</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>155</b>

**MATERIAL SUPLEMENTARIO**

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>163</b>
Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	163
Hibridación substractiva	163

Extracción, purificación y cuantificación de ARN	163
Síntesis de ADNc (ADN de cadena sencilla) y de ADNdc (ADN de doble cadena)	164
Biotinilación de ADNdc	164
Substracción	165
Amplificación del ADN específico, clonaje y secuenciación	165
Electroforesis bidimensionales de proteínas (2D)	166
Extracción de proteínas totales	166
Valoración y precipitación de proteínas	166
Electroforesis bidimensionales en geles de poliacrilamida (IPGphor, Ettan Dalt6)	167
Espectrometría de masas MALDI-TOF ( <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight</i> )	169
RESULTADOS	169
Identificación de genes que se expresan diferencialmente en el triple mutante hipermóvil	
KSW	169
Identificación de diferencias entre los proteomas de <i>P. fluorescens</i> F113 y del triple mutante	
KSW	172
BIBLIOGRAFÍA	175

CONCLUSIONES
--------------

Conclusiones	17
--------------	----





## ABREVIATURAS

2,4-D	2,4-diclorofenoxiacético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
ADNdc	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
AJ	Ácido jasmónico
AM	del inglés <i>Arbuscular Mycorrhiza</i>
AMPc	Adenosín monofosfato-3',5' cíclico
Amp	Ampicilina
ANOVA	del inglés <i>Analysis of Variance</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ARNs	Ácido ribonucleico de pequeño tamaño
AS	Ácido salicílico
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Cm	Cloranfenicol
CRS	del inglés <i>Catabolic Repression System</i>
C- terminal	Extremo carboxilo
DAPG	2,4-Diacetilfloroglucinol
DGC	Diguanilato ciclasa
DGGE	del inglés <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
di-GMPc	bis-(3', 5')- monofosfato de guanosina cíclico
DO	Densidad óptica
DOC	Ácido desoxicólico
DTT	Ditiotreitol
EAL	Motivo Glu-Ala-Leu
EPS	Exopolisacárido
Fig.	Figura
FISH	del inglés <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FP	del inglés <i>Fahraeus for Plant Medium</i>
GDP-manosa	Guanosina difosfato manosa
GGDEF	Motivo Gly-Gly-Asp-Glu-Phe
GFP	del inglés <i>Green Fluorescent Protein</i>
GMP	Guanosina monofosfato
Gn	Gentamicina
GTP	Guanosina trifosfato
HCN	Ácido cianhídrico
HD-GYP	Motivo His-Asp-Gly-Tyr-Pro
HSL	Homoserina-lactona
IAA	3-ácido indol acético
IAA	Yodo acetamida
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
ISR	del inglés <i>Induced Systemic Resistance</i>
IVET	del inglés <i>In Vivo Expression Technology</i>
Km	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
MA	del inglés <i>Millenium Ecosystem Assesment</i>
MALDI-TOF	del inglés <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight</i>

MCP	del inglés <i>Chemoreceptor-Methyl-Accepting Chemotaxis Protein</i>
N- teminal	Extremo amino
OMG	Organismo modificado genéticamente
ORF	del inglés <i>Open Reading Frame</i>
PAHs	del inglés <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>
PAS	del inglés <i>Par-ARNT-Sim</i>
PCR	del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCBs	del inglés <i>Polychlorinated Biphenyls</i>
PDA	Medio Agar Patata Dextrosa
PDE	Fosfodiesterasa
pGpG	5'- fosfoguanilil- (3'-5')- guanosina
PGPRs	del inglés <i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i>
PRs	Proteínas de resistencia
QS	del inglés <i>quorum sensing</i>
REC	Dominio regulador de respuesta
RC	Reguladores del crecimiento vegetal
Rif	Rifampicina
ROS	del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	revoluciones por minuto
RT	del inglés <i>Reverse Transcription</i>
RxxD	Motivo Arg-(x-x)-Asp
SA	Medio de cultivo Sacarosa-Asparragina
sp.	Especie
SAR	del inglés <i>Systemic Acquired Resitance</i>
Spc	Espectinomicina
Tc	Tetraciclina
TCA	Ácido tricloroacético
TGGE	del inglés <i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i>
ufc	Unidad formadora de colonia
VOCs	del inglés <i>Volatile Organic Compounds</i>
VF	Variación fenotípica

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

<b>Figura 1.1:</b> Interacciones y relaciones existentes entre la planta, el medio y las comunidades del suelo.	<b>4</b>
<b>Figura 1.2:</b> Esquema de una raíz y su rizosfera.	<b>6</b>
<b>Figura 1.3:</b> Rutas de transducción de señales en la ISR y la SAR.	<b>20</b>
<b>Figura 1.4:</b> Mecanismos de protección de plantas por los agentes de biocontrol.	<b>21</b>
<b>Figura 1.5:</b> Colonización de la rizosfera por distintas especies de <i>Pseudomonas</i> .	<b>26</b>
<b>Figura 1.6:</b> Componentes principales del flagelo.	<b>37</b>
<b>Figura 1.7:</b> Expresión génica y autoensamblaje del aparato flagelar.	<b>39</b>
<b>Figura 1.8:</b> Regulación de los genes implicados en la síntesis del flagelo de <i>P. aeruginosa</i> .	<b>40</b>
<b>Figura 1.9:</b> Etapas de la formación de una biopelícula.	<b>42</b>
<b>Figura 1.10:</b> Ruta de regulación del di-GMPc.	<b>46</b>
<b>Tabla 1.1:</b> Genes de <i>Pseudomonas</i> inducidos en colonización.	<b>27</b>

### CAPÍTULO 2: Mutantes de *Pseudomonas fluorescens* F113 afectados en la formación de biopelículas en superficies abióticas colonizan eficientemente la rizosfera

<b>Figura 2.1:</b> Biopelículas en superficies abióticas por parte de <i>P. fluorescens</i> F113 y derivados.	<b>88</b>
<b>Figura 2.2:</b> Movilidad tipo <i>swimming</i> y colonización competitiva de la rizosfera de alfalfa por F113, mutantes y variantes hipermóviles.	<b>91</b>
<b>Figura 2.3:</b> Colonización de la rizosfera de F113 y V35 marcados con GFP mediante microscopía de epifluorescencia.	<b>92</b>
<b>Figura 2.4:</b> Colonización de la rizosfera de alfalfa por parte de F113 y V35 mediante SEM.	<b>93</b>
<b>Tabla 2.1:</b> Composición de los medios de cultivo SA y LB.	<b>82</b>
<b>Tabla 2.2:</b> Componentes del medio FP.	<b>85</b>
<b>Tabla 2.3:</b> Parámetros de la formación de biopelículas.	<b>89</b>

**CAPÍTULO 3: Un mutante de *Pseudomonas fluorescens* F113 más competitivo, presenta mejorada su capacidad de biocontrol de hongos patógenos de raíz**

<b>Figura 3.1:</b> Movilidad tipo <i>swimming</i> : F113, <i>gacS</i> , <i>kinB</i> , <i>algB</i> , KG, KS, KW, V35, GSW y KSW.	<b>114</b>
<b>Figura 3.2:</b> Determinación de alteraciones en el metabolismo secundario.	<b>115</b>
<b>Figura 3.3:</b> Colonización competitiva de la rizosfera.	<b>117</b>
<b>Figura 3.4:</b> Análisis de biocontrol en el sistema <i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>Lycopersici</i> / <i>Lycopersicum esculentum</i> (tomate).	<b>118</b>
<b>Figura 3.5:</b> Análisis de biocontrol en el sistema <i>Phytophthora cactorum</i> (Pc)/ <i>Fragaria vesca</i> (fresa).	<b>120</b>
<b>Tabla 3.1:</b> Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.	<b>108</b>

**CAPÍTULO 4: *Pseudomonas fluorescens* F113 produce un segundo aparato flagelar que es importante para la colonización de la rizosfera**

<b>Figura 4.1:</b> Representación de las regiones flagelares de <i>P. fluorescens</i> F113 y <i>A. vinelandii</i> .	<b>141</b>
<b>Figura 4.2:</b> Análisis mediante PCR cuantitativa de los niveles de expresión de <i>flhDC</i> y <i>fliC2</i> en F113 y derivados.	<b>142</b>
<b>Figura 4.3:</b> Movilidad tipo <i>swimming</i> : F113, <i>fliC2</i> , <i>kinBfliC2</i> , <i>kinBflhDC</i> .	<b>143</b>
<b>Figura 4.4:</b> Movilidad tipo <i>swimming</i> : F113 y F113( <i>pflhDC</i> ).	<b>144</b>
<b>Figura 4.5:</b> Movilidad tipo <i>swimming</i> : F113, <i>kinB</i> , <i>fleQ</i> , <i>kinBfleQ</i> , <i>flgM</i> , <i>kinBflgM</i> .	<b>145</b>
<b>Figura 4.6:</b> Movilidad tipo <i>swimming</i> F113, <i>kinB</i> , <i>cyaA</i> , <i>vfr</i> , <i>kinBcyaA</i> , <i>kinBvfr</i> .	<b>146</b>
<b>Figura 4.7:</b> Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de F113 y derivados.	<b>147</b>
<b>Figura 4.8:</b> <i>Western blot</i> para la detección de la flagelina.	<b>148</b>
<b>Figura 4.9:</b> PCR cuantitativa de los niveles de expresión de <i>fliC2</i> en F113 y 4 variantes fenotípicos.	<b>148</b>
<b>Figura 4.10:</b> Colonización competitiva de la rizosfera de alfalfa por F113, <i>fliC2</i> , <i>kinB</i> y <i>kinBfliC2</i> .	<b>149</b>
<b>Figura 4.11:</b> Modelo de la posible regulación del segundo aparato flagelar en <i>P. fluorescens</i> F113.	<b>153</b>
<b>Tabla 4.1:</b> Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.	<b>135</b>
<b>Tabla 4.2:</b> Oligonucleótidos utilizados.	<b>137</b>

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

<b>Figura S1:</b> Esquema de la técnica de hibridación substractiva.	<b>165</b>
<b>Figura S2:</b> Resultados globales de la hibridación substractiva tras la secuenciación.	<b>170</b>
<b>Figura S3:</b> Geles bidimensionales de proteínas.	<b>173</b>
<b>Tabla S1:</b> Composición del tampón de rehidratación.	<b>167</b>
<b>Tabla S2:</b> Composición de la solución de equilibrado.	<b>168</b>
<b>Tabla S3:</b> Clones secuenciados de la hibridación substractiva pertenecientes a KSW.	<b>171</b>
<b>Tabla S4:</b> Proteínas de KSW identificadas por MALDI-TOF.	<b>174</b>











## ***CAPÍTULO 1***

### **INTRODUCCIÓN GENERAL**

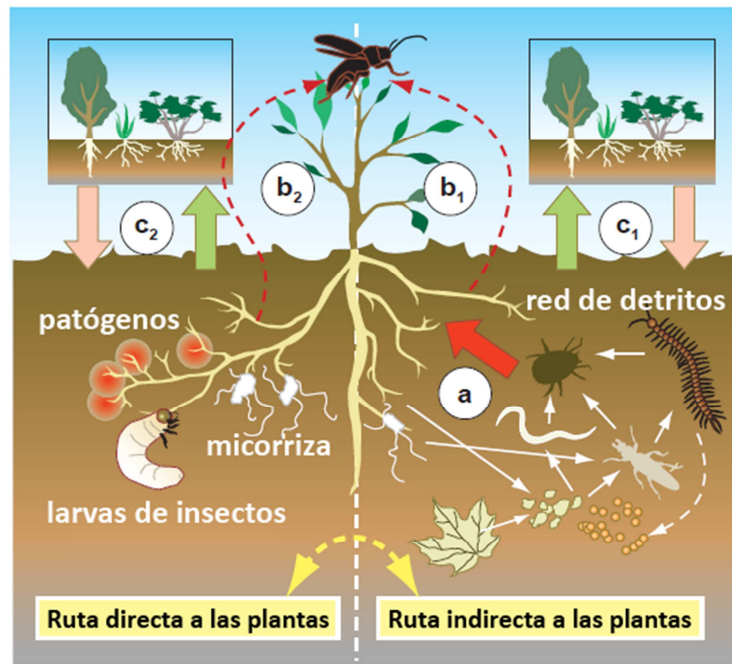


## 1. ECOSISTEMAS TERRESTRES Y AGRÍCOLAS

Según la Evaluación de los Ecosistemas del Milenio o MA (del inglés *Millenium Ecosystem Assesment*), en los últimos 50 años, el hombre ha sido capaz de transformar drásticamente los ecosistemas, con el fin de encontrar una salida rápida a la creciente demanda de alimentos y productos de primera necesidad. El conjunto de cambios generados ha supuesto un incremento en el bienestar humano y desarrollo económico, pero también ha contribuido a la destrucción, en algunos casos, de la diversidad de la vida en la Tierra. Por supuesto, esto se puede extender a los sistemas agrícolas o agroecosistemas. La MA documenta el fuerte impacto ambiental que genera la agricultura, pero la gran importancia que tiene para la humanidad, de ahí que se deba encontrar un equilibrio y poder así llegar al concepto de agricultura sostenible.

La degradación y mal uso del suelo por acción del hombre, debido a los métodos de producción agrícola actuales, como la utilización de fertilizantes y pesticidas químicos (Gunnell y col., 2007), ha reducido la capacidad de producción en los campos agrícolas mundiales en un 40% (Oldeman, 1994). Los suelos sufren degradación física como erosión y compactación; química, debido a la acidificación de nutrientes, la contaminación por el uso de pesticidas y fertilizantes; y también una degradación biológica debido a la pérdida de biodiversidad (Doran y Zeiss, 2000; Pretty y Shah, 1997). Una de las claves para conseguir una agricultura sostenible es lo que se denomina “salud del suelo” o *soil health*, término utilizado para describir las características generales y la calidad de los recursos del suelo (Kibblewhite y col., 2008). En la literatura se pueden encontrar dos visiones distintas que argumentan el concepto de salud del suelo. Por una parte, la más antigua, llamada reduccionista, se basa en la estimación de las condiciones del suelo usando indicadores físicos, químicos y biológicos (Doran y Jones, 1996; Van-Camp y col., 2004). Por otro lado, existe la visión integradora que define la posibilidad de la existencia de propiedades emergentes del suelo, consecuencia de la interacción de diferentes procesos (Harris y col., 1996).

Con este enfoque integrador, los ecosistemas terrestres, y por tanto también los agrícolas, se pueden entender como un conjunto de componentes tanto de superficie como del suelo, que interactúan para influir en los procesos y propiedades del ecosistema a distintos niveles (Wardle y col., 2004) (Fig. 1.1). Así, de forma muy resumida, podríamos decir que las plantas (productores) son los encargados de suministrar, por una parte, el carbono orgánico necesario para los descomponedores, y por otra, los recursos para organismos que están asociados a las raíces: algunos herbívoros, patógenos, simbioses y mutualistas.



**Fig. 1.1:** Esquema de las interacciones y relaciones existentes entre la planta, el medio y las comunidades del suelo. **Derecha:** Actividades alimentarias de los descomponedores. Las flechas blancas indican una red alimentaria que estimulan el flujo de nutrientes (flecha roja), la adquisición por parte de la planta (a) y su rendimiento, lo cual influye de forma indirecta en los herbívoros aéreos (flecha roja discontinua (b<sub>2</sub>)). **Izquierda:** Los organismos del suelo ejercen efectos directos en la planta, bien porque se alimentan de sus raíces, o bien porque mantienen relaciones con ésta de tipo mutualista o antagonista. Estas interacciones directas con la planta, no sólo influyen en su rendimiento, sino también en los herbívoros aéreos (b<sub>2</sub>) que son potencialmente sus depredadores. Además, la red puede controlar el desarrollo de otras comunidades vegetales, directamente (c<sub>2</sub>) e indirectamente (c<sub>1</sub>), lo que a su vez influye en los organismos del suelo. Obtenido de Wardle y col. (2004).

En los siguientes apartados nos vamos a centrar en la microflora del suelo y la que está asociada a las raíces de las plantas, y más concretamente, en las bacterias y su importancia en la agricultura.

## 2. SUELO Y SUELO RIZOSFÉRICO

El suelo está formado por partículas de diferentes tamaños, formas y características químicas. Pero además, también componen el suelo la biota (conjunto de organismos que ocupan un ecosistema) y elementos orgánicos en diferentes estados de descomposición (Daniel, 2005). Podríamos afirmar que este ecosistema es quizá el más complicado de abordar por los microbiólogos, debido al gran tamaño de las comunidades microbianas presentes y a la enorme diversidad de especies. Un gramo de suelo de bosque contiene aproximadamente  $4 \times 10^7$  células procariotas (Richter y Markewitz, 1995), pero estas cifras aumentan hasta dos órdenes de magnitud cuando nos referimos a un suelo cultivado (Paul y Clark, 1989).

La microflora del suelo está constituida por bacterias, hongos, algas, etc., los cuales juegan un importante papel en las transformaciones de la materia que ocurre en estos ambientes terrestres. Estos microorganismos, que son los organismos que forman la mayor parte de la biomasa del suelo (entre 5 y 50 toneladas por hectárea) (Hassink y col., 1997), presentan una alta diversificación y están en constante cambio debido a las fluctuaciones ambientales (Chaussod, 1996). A menudo se encuentran fuertemente adheridos a las partículas de arena o arcilla, por lo que podemos decir que sus microhábitats son las superficies de los agregados además de los poros que se forman entre éstos (Foster, 1988; Hassink y col., 1997).

El metabolismo y la supervivencia de estos microorganismos del suelo están claramente influenciados por la cantidad de agua y nutrientes, por lo tanto, son poblaciones que continuamente están siendo alteradas dependiendo de los cambios que se produzcan en el contenido en agua y en otro tipo de factores ambientales como el pH, la disponibilidad de oxígeno o la temperatura.

Durante mucho tiempo, y hasta el desarrollo de la Ecología Microbiana Molecular, conocer la diversidad microbiana del suelo era un proceso muy limitado. Únicamente, por medio de técnicas de aislamiento y posterior cultivo, se podía hacer una estimación del número de microorganismos existentes. Posteriormente, gracias a varios trabajos, se sabe que solamente entre el 0.1% y el 1% de las bacterias existentes en el suelo son cultivables (Amann y col., 1995; Torvisk y col., 1990; Torvisk y col., 1996). La conclusión de todo esto, es que hasta hace muy poco tiempo, las comunidades microbianas del suelo estaban muy poco exploradas.

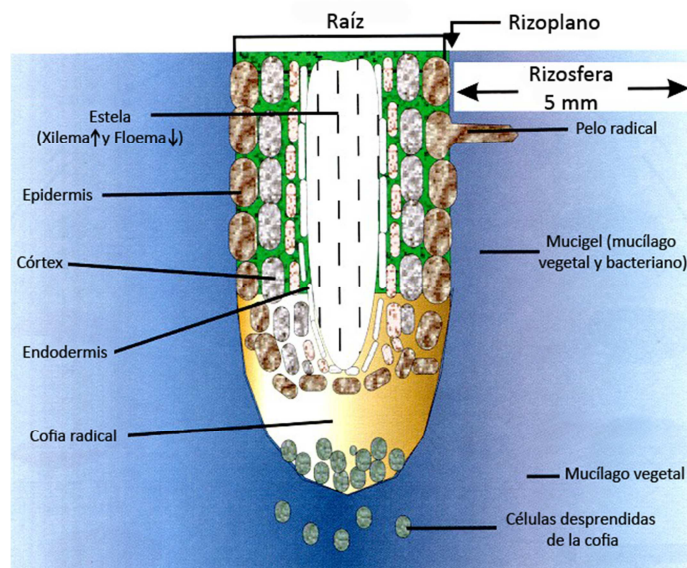
Hoy en día, nuevas técnicas de análisis de biología molecular como PCR, secuenciación, clonación o el uso de marcadores filogenéticos como el gen 16S del ARNr, muestran una asombrosa diversidad de especies no cultivables en prácticamente todo tipo de ambientes (Barns y col., 1999). Y por último, otra estrategia en expansión, la metagenómica, nos ha colocado muy cerca de conocer la relación estructura-función de un ecosistema. Todo esto es realmente importante para entender cómo funcionan los ecosistemas terrestres, entre otros, y por supuesto, el que cobra una gran importancia en este trabajo: la rizosfera.

### **3. RIZOSFERA**

Las plantas presentan la capacidad de adaptarse a gran cantidad de ambientes de muy diversos tipos, algunos incluso extremos (Bowen y Rovira, 1999). El desarrollo y la

supervivencia de las plantas, así como la productividad de los cultivos, va a estar ligada íntimamente a esta capacidad, que a su vez depende del conjunto de interacciones que tengan lugar entre la propia planta y los factores bióticos y abióticos que la rodean.

Muchas de estas interacciones tienen lugar en una zona localizada en el entorno de las raíces, la cual se conoce con el nombre de rizosfera (Fig 1.2). El término rizosfera fue empleado por primera vez por Hiltner en 1904 para describir el lugar dónde los procesos mediados por microorganismos están bajo la influencia del sistema radicular. La zona que abarca la rizosfera no se puede definir fácilmente, pero se puede dividir en tres zonas físicas más o menos marcadas (Lynch, 1987): endorrizosfera (tejido de la raíz incluyendo la endodermis y la región cortical), rizoplano (superficie radicular y capa de mucílago) y ectorrizosfera (zona de aproximadamente 5 mm de espesor que es adyacente al sistema radicular) (Morgan y col., 2005) (Fig 1.2).



**Fig. 1.2:** Esquema de una raíz y su rizosfera. En la imagen se nombran los tejidos vegetales de esta zona de la raíz: xilema y floema, rodeados de la endodermis, córtex y epidermis. Como se puede apreciar, la rizosfera es la zona del suelo adyacente a la raíz, que suele tener unos 5 mm de espesor. Obtenido de Maier y col. (2000).

Las funciones de la rizosfera son realmente importantes para la salud y la nutrición de la planta. Se han reconocido dos grandes grupos de interacciones en la rizosfera, las relacionadas con la materia vegetal muerta, que afectan a la circulación de nutrientes y energía; y aquellas basadas en las raíces “vivas” de la planta. Ambos tipos de interacciones son relevantes tanto para la ecología como para la agricultura (Barea y col., 2005).

El efecto rizosférico ha sido muy bien estudiado, y describe el fenómeno de aumento de la cantidad y actividad de los microorganismos en comparación con un suelo carente de plantas, como consecuencia de los compuestos exudados por la raíz (Buée y col., 2000; Raaijmakers y col., 2009; Sorensen, 1997).

Las plantas continuamente están secretando rizodeposiciones a la rizosfera (Rovira, 2005; Uren, 2000), las cuales son un factor clave para que tenga lugar un enriquecimiento de poblaciones microbianas específicas. Aunque sobre este tema hay cierta controversia en la literatura; existen autores que afirman que el tipo de suelo es el factor dominante, mientras otros aseguran que es la planta la que determina su rizosfera y las poblaciones características en la misma. Girvan y col. (2003) analizan por medio de técnicas tradicionales y moleculares, los efectos de diferentes tipos de suelo, cultivados o no, en las comunidades microbianas y afirman que cuando hay cambios en las características físicas o químicas del suelo, se modifica la estructura de la población de microorganismos. Sin embargo, Nunan y col. (2005) demuestran mediante DGGE (del inglés *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) que las plantas eran incapaces de ejercer ningún efecto sobre una población microbiana añadida a posteriori en su rizosfera. También es interesante resaltar un trabajo en el que se analizaron tres tipos de plantas que fueron crecidas en tres tipos de suelos de California. Como en el caso anterior, aislaron ADN total de los suelos y con técnicas de huella genética concluyeron que la comunidad bacteriana de la rizosfera está afectada por una compleja interacción entre el tipo de suelo y la especie de planta (Marschner y col, 2001).

Por tanto, es realmente importante la microflora existente en el rizoplaneo. De hecho, es sabido que las plantas secretan, a través de sus raíces, entre un 10% y un 44% del carbono fijado fotosintéticamente (Bais y col., 2006). Los exudados radiculares se pueden clasificar en (1) exudados de bajo peso molecular, (2) exudados de alto peso molecular y (3) en compuestos orgánicos volátiles o VOCs (del inglés *Volatile Organic Compounds*) (Ortíz-Castro y col., 2009). Los compuestos de bajo peso molecular representan la mayor proporción de las rizodeposiciones y consisten en azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, fenoles, vitaminas y algunos metabolitos secundarios. Dentro de los exudados de alto peso molecular podemos encontrar proteínas y el mucílago. El resto de metabolitos secundarios, así como los alcoholes y los aldehídos constituyen los VOCs (Badri y Vivanco, 2009; Schulz y Dickschat, 2007).

Los microorganismos contribuyen también a la secreción en la rizosfera de este tipo de compuestos resultado de su metabolismo secundario, como por ejemplo, reguladores del

crecimiento vegetal, fitotoxinas, enzimas, sideróforos, etc, lo que indica que éstos influyen directamente en el desarrollo y promoción del crecimiento vegetal (van Loon, 2007).

La cantidad y composición de los exudados radiculares es específica de cada familia de plantas, incluso de cada especie. Cabe destacar, por ejemplo, que en aquellos ambientes en los que existe carencia de nutrientes, los exudados de las raíces pueden modificarse con el objetivo de establecer relaciones estrechas con microorganismos del suelo que estén implicados en la captación de nutrientes necesarios para la planta (revisado por Dakora y Phillips, 2002). Los exudados también pueden actuar como moléculas señal que inician el proceso simbiótico con organismos como rizobios u hongos beneficiosos (Badri y Vivanco, 2009). Y al respecto, es interesante el trabajo de Mark y col. (2005), donde analizan los exudados de dos variedades distintas de remolacha. Observaron que la rizosfera seleccionaba poblaciones de *Pseudomonas* genéticamente diferentes. Mediante transcriptómica definieron varios genes de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 que se expresaban solo en presencia de uno de los tipos de exudados.

### **3.1. ¿Quién vive en la rizosfera?**

Desarrollándose y creciendo en la rizosfera podemos encontrar una amplia variedad de tipos de microorganismos. Además, está universalmente aceptado que cualquier grupo de organismos que estén asentados en esta zona del suelo, intervienen en alguna función importante dentro del ecosistema (Giri y col., 2005). De hecho, en la literatura se pueden encontrar una gran cantidad de estudios que profundizan en la microbiología de la rizosfera, describiendo las interacciones entre microorganismos y centrándose mayoritariamente en bacterias y hongos (Bowen y Rovira, 1999). No obstante, la mayor parte de trabajos que se refieren a bacterias se restringen a las Eubacterias, debido a que otros grupos de microorganismos del suelo, como las Arqueas, han sido menos estudiados.

## **4. INTERACCIÓN PLANTA- MICROORGANISMO**

Aún se desconoce cómo tienen lugar muchas de las interacciones planta-microorganismo, y de las más estudiadas, tampoco se tiene un completo conocimiento. No está del todo claro como es el proceso, ya que no importa si el microorganismo es patógeno o beneficioso, porque a menudo va a utilizar los mismos mecanismos aunque usen diferentes combinaciones. Sin embargo, sí es conocido que las herramientas que los microorganismos usan para interactuar con las plantas, son las mismas a las que recurren para relacionarse



con otros eucariotas, como hongos, animales o humanos; e incluso en la interacción microorganismo-microorganismo (Chin-A-Woeng y col., 2000; Lugtenberg y Dekkers, 1999; Lugtenberg y col., 2001). En función del efecto que causen en la planta, las interacciones planta-microorganismo pueden ser por tanto clasificadas como saprófitas, patogénicas o beneficiosas.

#### **4.1. Interacciones no beneficiosas**

Los microorganismos patógenos afectan en mayor o menor medida a la salud de la planta y son la principal amenaza para la estabilidad de los ecosistemas y la producción de alimentos a nivel mundial (Compant y col., 2005). Los hongos son los fitopatógenos más importantes, seguidos de los virus y las bacterias (Lugtenberg y col., 2002). En una situación normal, la planta rechaza la acción del organismo patógeno, es decir, las plantas no suelen ser colonizadas ni infectadas por el fitopatógeno; es una “planta no hospedadora” para ese microorganismo. Este fenómeno es llamado interacción incompatible. Pero pueden existir casos en los cuales tiene lugar una alta especificidad del fenómeno, denominado interacción compatible, de tal manera que genes de la planta reconocen genes del patógeno, lo que desencadena una respuesta defensiva en la planta.

#### **4.2. Interacciones beneficiosas**

Son muy numerosas las interacciones beneficiosas planta-microorganismo, y hay que resaltar, que son realmente importantes, ya que todas ellas conducen a aumentar el bienestar, el desarrollo y la salud vegetal. En la mayoría de los casos, en una interacción de este tipo, están implicados varios mecanismos (Berg y col., 2002; Haas y Defago, 2005). Los mecanismos directos que promueven el crecimiento vegetal son difíciles de diferenciar de aquellos que suprimen la enfermedad. Pero lo que sí se sabe, es que para que una interacción planta-microorganismo tenga éxito, es imprescindible que haya una colonización competente de la rizosfera (Kamilova y col., 2005; Lugtenberg y col., 2002).

Los pasos que tienen lugar en el proceso de colonización están bien definidos, e incluyen reconocimiento, adherencia, invasión (en caso de microorganismos endofíticos), crecimiento y varias estrategias que sirvan para establecer definitivamente la interacción. Las raíces de las plantas inician un diálogo con los microorganismos del suelo mediante la producción de señales que son reconocidas por éstos, que a su vez producen moléculas señal para comenzar la colonización (Bais y col., 2006).

La amplia variedad de esta clase de relaciones ha supuesto el establecimiento de distintos tipos de clasificaciones. Resumiendo, las vamos a dividir en (1) interacciones planta-hongos simbiotes, (2) interacciones planta-hongos de vida libre e (3) interacciones planta-Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o PGPRs (del inglés *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*).

### 4.2.1. Interacción planta-hongos simbiotes

La asociación simbiótica entre un hongo y la raíz de una planta se denomina micorriza (Cooke, 1977; Hartley, 1965; Powel, 1982). Los hongos micorrízicos son miembros relevantes de la rizosfera y estas poblaciones de microsimbiontes son responsables de llevar a cabo funciones determinantes dentro del ecosistema, como la mejora del establecimiento de la planta en el ambiente en el que se va a desarrollar, el aumento de la eficacia en captación de nutrientes por parte de la planta y la protección de la misma contra los estreses ambientales (Smith y Read, 1997). Las micorrizas se clasifican en ectomicorrizas (Marks y Kozlowski, 1973) y endomicorrizas (Sanders y col., 1975), dependiendo si las hifas del hongo llegan a penetrar en las células de la raíz. Más del 80% de los cultivos de interés alimentario presentan endomicorrizas, concretamente las llamadas arbusculares o AM (del inglés *Arbuscular Mycorrhiza*) (Smith y Read, 1997), en las cuales, el hongo es del orden Glomales (Zygomycota).

Está universalmente aceptado que la simbiosis AM deriva en un aumento de los suministros de nutrientes minerales que necesita la planta, particularmente aquellos que su forma iónica presenta muy baja movilidad o que están en concentraciones prácticamente inexistentes, como son el fosfato, el amonio, el zinc y el cobre. Los entramados que forman las hifas del hongo implican un aumento de la extensión física del sistema radicular, y por tanto un incremento del área de superficie disponible para la absorción de nutrientes.

Pero como hemos comentado antes, este tipo de asociación mutualista no solo favorece la captación de nutrientes; además implica un aumento en el bienestar de la planta debido a la protección frente estreses bióticos y abióticos. De ahí que este tipo de simbiosis se vea como una posible aplicación en biocontrol de patógenos de plantas. Son varios los trabajos que muestran como las plantas inoculadas o que presentan una asociación micorrízica tienen un menor desarrollo de enfermedades frente a un amplio rango de agentes patógenos (St-Arnaud y Vujanovic, 2007; Whipps, 2004), incluyendo *Phytophthora nicotianae* cuando infecta a plantas de tomate previamente colonizadas por el hongo *Glomus mosseae* BEG 12 (Cordier y col., 1996; Trotta y col., 1996; Vigo y col., 2000).

Debido a que la asociación raíz-AM constituye una de las relaciones más importantes en la estructura de la comunidad de los microorganismos del suelo, se habla también de la zona de influencia de las micorrizas como micorrizosfera (Linderman, 1988; Lioussanne y col., 2009; Marschner y col., 2001; Marschner y Timonen, 2005), es decir, la formación de las micorrizas puede afectar a las poblaciones microbianas de la rizosfera de forma directa o indirecta, a través de cambios en los patrones de los exudados radiculares o del propio hongo (Linderman, 1992). A la inversa, numerosos microorganismos del suelo interactúan con los hongos micorrízicos mediante la producción de fitohormonas o inhibidores del crecimiento de patógenos (Jeffries y Dodd, 1996).

Pero en los últimos años, lo que se está intentando es conocer de forma muy precisa qué interacciones microbianas pueden tener lugar en la micorrizosfera para conseguir llegar a lo que antes denominábamos agricultura sostenible (Johansson y col., 2004).

#### **4.2.2. Interacción planta-hongos de vida libre**

Los hongos tienen la ventaja, frente a las bacterias inoculadas, de ser generalmente más efectivos a la hora de propagarse a través del suelo y de la rizosfera. Los mecanismos que implican una mejora del crecimiento y desarrollo vegetal por parte de estos hongos, tienen que ver con procesos de competición de nicho con hongos fitopatógenos y producción de sustancias antibióticas. Pero también, muchos organismos de este tipo son capaces de colonizar esporas, hifas u otros hongos patógenos, resultando en procesos de biocontrol. En el micoparasitismo se pone de manifiesto la producción de varias clases de enzimas degradadoras, como quitinasas, proteasas y glucanasas (Harman y col., 2004).

Las especies de *Trichoderma* pertenecen a esta clase de hongos de vida libre que son comunes en la rizosfera y resultan beneficiosos para las plantas. Además de presentar capacidades micoparásitas, muchas especies de *Trichoderma* pueden crecer en asociación con las raíces de las plantas, incrementando así el desarrollo y crecimiento de las mismas. La colonización por este hongo, muy raramente supone un efecto perjudicial en la planta ni suele conducir a una interacción patogénica (Harman y col., 2004). De hecho, el asentamiento en la raíz por parte de *Trichoderma* está frecuentemente asociado con la inducción de una respuesta de defensa local y sistémica, lo que depende de la producción por parte del hongo, de una proteína elicitora llamada Sm1 (del inglés *small protein 1*) (Djonovic y col., 2006).

Recientemente se ha documentado como algunas especies de *Trichoderma* también están implicadas en promover el crecimiento y desarrollo vegetal (Harman, 2006). Las cepas *T. virens* y *T. atroviride* son capaces de producir 3-ácido indol acético (IAA) y otros compuestos relacionados con la fitohormona auxina, lo que conlleva un aumento de las raíces secundarias y de los pelos radiculares en plantas de *Arabidopsis* (Contreras-Cortejo y col., 2009).

### **4.2.3. Interacción planta-PGPR**

Otro grupo de microorganismos que se encuentran en la rizosfera es un subconjunto muy heterogéneo de bacterias, denominadas rizobacterias (Kloepper, 1994), las cuales se caracterizan por sus habilidades a la hora de colonizar las raíces y por ser capaces de mejorar el desarrollo de las plantas. Por este motivo, también se las denomina Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o PGPRs. Estas bacterias de vida libre, que suponen una gran importancia para la agricultura, estimulan la salud y el crecimiento de la planta, suprimen las enfermedades causadas por fitopatógenos y aceleran la captación y asimilación de nutrientes (Babalola, 2010). Por todas estas características, resulta interesante conocer y estudiar cuáles son sus mecanismos de acción, de tal manera que su uso tenga como objetivo mejorar la fertilidad del suelo, aumentar la productividad de los cultivos y reducir el impacto que ha tenido el uso incontrolado de fertilizantes químicos en los campos de cultivo.

Frente a la utilización de compuestos sintetizados químicamente, como pesticidas o fertilizantes, los inoculantes microbianos presentan diversas ventajas: (1) son más económicos, (2) generan menor daño al medio ambiente y presentan un bajo riesgo para la salud humana, (3) muestran una mayor actividad específica, (4) son más efectivos en pequeñas cantidades, (5) se multiplican, pero las divisiones son controladas de alguna manera por la planta, del mismo modo que ocurre con las poblaciones autóctonas de la rizosfera, (6) actúan más rápidamente que los pesticidas convencionales, y (7) pueden ser utilizados de forma convencional o integrada en el mantenimiento de plagas (Berg, 2009).

Los mecanismos de acción de las PGPRs se pueden clasificar en directos e indirectos (Glick, 1995). La diferencia entre ambos resulta en ocasiones complicada de establecer, pero en general, se consideran mecanismos directos aquéllos que requieren la participación de los procesos metabólicos de la planta, mientras que los indirectos, se refieren a los que ocurren fuera del organismo vegetal. A continuación vamos a describir el papel que tienen las PGPRs como biofertilizantes, fitoestimulantes, fitorremediadores y como agentes de biocontrol.

#### 4.2.3.1. PGPRs como biofertilizantes

Se define biofertilizante como una sustancia que contiene microorganismos vivos, y que cuando se aplica en las semillas, en la superficie de la planta o en el suelo, éstos son capaces de colonizar la rizosfera o el interior de la planta y promover el desarrollo suministrando nutrientes (Vessey, 2003). No todas las PGPRs se consideran biofertilizantes, pero es muy común que un mismo grupo de bacterias sea al mismo tiempo biofertilizante y biopesticida. Un ejemplo es *Burkholderia cepacia* que presenta actividad de biocontrol frente a *Fusarium* spp., y al mismo tiempo, a través de la producción de sideróforos secuestradores de hierro, estimula el crecimiento de la planta de maíz (Bevivino y col., 1998). Hay que tener en cuenta, que no todos los biofertilizantes contienen PGPRs, porque también han de considerarse aquéllos compuestos por micorrizas arbusculares.

Uno de los mecanismos por los cuales las PGPRs mejoran el estado nutricional de la planta es a través de la fijación biológica del nitrógeno. Existen relaciones endosimbióticas muy específicas, como es el caso de los rizobios (incluyendo *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*) e incluso varias cepas de betaproteobacterias, con leguminosas, o menos estrictas, como por ejemplo las de *Azotobacter* o *Azospirillum* con otras plantas. En cualquier caso, la bacteria en el interior de los nódulos o asociada a las raíces, fija el N<sub>2</sub> atmosférico y lo transforma en amonio para que pueda ser utilizado por la planta. La solubilización de fosfatos es otro proceso que realizan microorganismos que están incluidos en el género *Pseudomonas* (Cattelan y col., 1999) y *Bacillus* (Pal, 1998; Singh y Kapoor, 1999) entre otros muchos. La secreción de ácidos orgánicos y fosfatasas es un método común entre las rizobacterias para generar formas de P soluble que pueda ser absorbido por la planta (Kim y col., 1998). Además, muchos microorganismos asociados a las raíces son capaces de producir sideróforos, que secuestran formas oxidadas del hierro (Fe<sup>3+</sup>) formando complejos que sí pueden ser tomados por la planta (Bar-Ness y col., 1991; Wang y col, 1993). Aunque la importancia de estos quelantes de hierro parece estar más asociada con el control biológico, del que hablaremos más adelante.

#### 4.2.3.2. PGPRs como fitoestimulantes

Las bacterias que son fitoestimuladoras promueven el crecimiento de la planta de forma directa. La producción de reguladores del crecimiento vegetal (RC) o fitohormonas por microorganismos es un hecho demostrado hace más de 25 años.

Varias especies de bacterias producen auxinas como parte de su metabolismo, incluyendo IAA o sus precursores (Spaepen y col., 2007); y parece ser que el efecto sobre la planta es básicamente a nivel del sistema radicular, fomentando por ejemplo la aparición de raíces laterales y pelos radicales. *Bacillus megaterium* (López-Bucio y col., 2007) y varias especies de *Pseudomonas* (Preston, 2004) se han descrito como productores de auxinas, aunque se estima que el 80% de las rizobacterias las producen. En el caso de *Azospirillum*, la auxina es la hormona vegetal más abundante secretada por esta bacteria (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000), y sin duda, el factor más determinante en la estimulación del desarrollo de la raíz. También se ha descrito como muchas especies de PGPRs son fitoestimuladoras mediante la producción de otros RCs, como giberelinas, citoquininas (Babalola, 2010; Vessey, 2003) o etileno (Lambrecht y col., 2000).

#### **4.2.3.3. PGPRs como agentes de rizadorremediación**

La biorremediación se define como la utilización de microorganismos u otros sistemas biológicos para la eliminación de compuestos contaminantes existentes en el medio ambiente (Caplan, 1993; Dua y col., 2002). En las últimas décadas, se han gastado billones de dólares con el fin de conseguir limpiar sitios contaminados de sustancias recalcitrantes (Rosenberg, 1993), ya que se han estado empleando técnicas convencionales, como la incineración, que son demasiado costosas (Kuiper y col., 2004). Las principales ventajas que la biorremediación presenta frente a otras estrategias son (1) la aplicación *in situ*, (2) la ausencia de alteración en la matriz del suelo y (3) que la degradación bacteriana del contaminante suele desembocar en su mineralización (Heizter y Sayler, 1993)

Algunos acercamientos dentro de la biorremediación, como la atenuación natural (Liu y Suflita, 1993), el bioaumento (Grosser y col., 1991; Yee y col., 1998) o la fitorremediación (Cunningham y Ow, 1996; Saxena y col., 1999; Wenzel y col., 1999), son herramientas utilizadas para degradar, extraer o secuestrar los compuestos recalcitrantes presentes en los ecosistemas, pero presentan limitaciones. Muchos estudios apuntan un nuevo método que resulta eficaz para la restauración de suelos contaminados, denominado rizadorremediación (Anderson y col., 1993; Schwab y Banks, 1994; Yee y col. 1998). En la rizadorremediación, la planta proporciona nutrientes, aireación, soporte y una mayor disponibilidad de sustrato, mientras que la rizobacteria participa mediante la remediación enzimática. El uso de la interacción planta bacteria está siendo investigado como consecuencia de su bajo coste, además de por la ausencia de perjuicios en el medio ambiente (Gerhardt y col., 2009). Pero también presenta sus inconvenientes. El más importante es que la mayor parte de las cepas

con capacidad de biodegradar, no son buenos colonizadores. No obstante, el éxito de esta estrategia va a depender de la capacidad que tengan las PGPRs de degradar los contaminantes, lo cual implica que las bacterias sean eficientes colonizadoras de las raíces de las plantas (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Por este motivo, las cepas más empleadas son especies de géneros que se caracterizan por ser los mejores colonizadores de la rizosfera, como *Pseudomonas* o *Burkholderia*.

En el estudio de Kingsley y col. (1994) se confirma que *Pseudomonas putida* protege a la planta de trigo debido a que es capaz de degradar el herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Un estudio con resultados similares se obtuvo con la cepa *B. cepacia* DBO1, que únicamente colonizaba bien la planta de cebada cuando en el medio existían concentraciones de entre 10 y 100 mg de 2,4-D por kg de suelo (Jacobsen, 1997). Debido a la importancia de la colonización eficiente de la raíz para obtener mejores resultados en rizorremediación, Kuiper y col. (2001) desarrollaron un nuevo procedimiento para seleccionar buenos candidatos para este cometido. Tras tres pases de colonización de una mezcla de bacterias existentes en las raíces de la planta, obtuvieron las rizobacterias que mejor colonizaban y que además crecían en naftaleno, protegiendo a la planta de la toxicidad generada por este PAHs (del inglés *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*). Uno de los primeros trabajos de degradación de bifenilos policlorados o PCBs (del inglés *Polychlorinated Biphenyls*) por parte de rizobacterias fue el de Brazil y col. (1995). Mediante ingeniería genética introdujeron un plásmido portador de los genes implicados en la ruta de degradación de PCBs en *P. fluorescens* F113, para posteriormente comprobar que se expresaban en rizosfera, que había degradación de los compuestos contaminantes y que F113pcb no perdía sus habilidades colonizadoras. Esta cepa fue mejorada con posterioridad para permitir que los niveles de eliminación del contaminante fueran mucho mayores (Villacieros y col., 2005). En la misma línea Yee y col. (1998) construyeron una cepa de *Pseudomonas fluorescens* portadora del gen *tomA* (tolueno O-monooxygenasa) que degradaba eficientemente el tricloroetileno (TCE) añadido en los microcosmos. Este tipo de estrategias también han sido empleadas ya para la biorremediación de tolueno (Barac y col., 2004), o incluso de metales pesados como el cadmio (Wu y col., 2006).

#### **4.2.3.4. PGPRs como agentes de biocontrol**

El control biológico de las enfermedades o biocontrol se estudia como un sistema de tres elementos que consiste en la planta, el organismo patógeno y el microorganismo con actividad de biocontrol, aunque el tipo de sustrato también es un factor a tener en cuenta.

Debe existir en la rizosfera un número suficiente de PGPRs con capacidad de biocontrol para que haya un efecto beneficioso en la planta y se estima que el 10% de las rizobacterias presentan esta habilidad (Rezzonico y col., 2007). Esto supone que una eficiente colonización de la raíz parece ser una característica clave para que el control biológico tenga éxito (Haas y Defago, 2005).

Los agentes de biocontrol pueden ejercer su función mediante varios mecanismos de acción. La producción de antibióticos, la competencia por espacio y nutrientes y la inducción de resistencia sistémica, son tres de los más estudiados y documentados, sobre todo en lo referente a especies de *Pseudomonas*.

### **Producción de antibióticos**

Los antibióticos componen un grupo muy heterogéneo de compuestos químicos orgánicos producidos por los microorganismos, y que se caracterizan por presentar un bajo peso molecular. Cuando se encuentran en bajas concentraciones, producen un efecto deletéreo en otros organismos (Thomashow y col., 1997). Los antibióticos se han ido aislando y caracterizando sus estructuras químicas a partir de cepas con capacidad de biocontrol, representadas por muchos géneros de bacterias. Además, se ha determinado que este tipo de PGPRs, no sólo presentan un amplio rango en la diversidad del tipo, sino también en el número de antibióticos producidos. Esto sugiere que hay antibióticos más específicos para suprimir un tipo de enfermedad, y otros, más generales, que no antagonizan a un solo tipo de fitopatógeno (Bender y col., 1999; Keel y col., 1996).

Muchos de los datos que se tienen del espectro de acción de los antibióticos, derivan de experimentos realizados *in vitro*, en los que la capacidad de biocontrol de la cepa a estudiar se analiza en placas en las que se inocula también el patógeno. El hecho de que los antibióticos podían suprimir enfermedades vegetales se demostró, por un lado, viendo que el efecto frente a un patógeno de un antibiótico purificado y un cultivo de la cepa silvestre a analizar, era el mismo (Kang y col., 1998; Nakayama y col., 1999); y por otro, inactivando la producción de estos compuestos mediante mutagénesis. Las cepas mutantes, en la mayoría de los casos, perdían la capacidad de antagonizar fitopatógenos, y cuando se complementaban, se restauraba el fenotipo de la cepa silvestre (Chin-A-Woeng y col., 1998; Keel y col., 1990; Vincent y col., 1991).



Muchas *Pseudomonas* constituyen, junto con bacterias de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, la fracción más importante de una comunidad rizosférica (Chin-A-Woeng y col., 2003), y su presencia esta a menudo asociada a la supresión de enfermedades (Chapon y col., 2002).

Las *Pseudomonas* generan una gran cantidad de compuestos resultado de su metabolismo secundario (Cook y col., 1995; Leisinger y Margraff, 1979) que alteran el crecimiento y el metabolismo de otros organismos dañinos para las plantas. Entre el 1% y el 21% de las *Pseudomonas* rizosféricas producen sustancias antibióticas (Chin-A-Woeng y col., 1997; Van den Broek y col., 2003), siendo los más frecuentes y efectivos algunos como fenazinas, lipopéptidos cíclicos, pioleuterina, 2,4-Diacetilfloroglucinol (DAPG), pirrolnitrina, además del compuesto volátil ácido cianhídrico (HCN) (Raaijmakers y col., 2002). Algunos como el DAPG, están implicados en la protección de varias especies de plantas frente a distintos tipos de patógenos (Rezzonico y col., 2007; Weller, 2007).

Es importante remarcar, que aunque se haya demostrado que una cepa es capaz de antagonizar a un fitopatógeno *in vitro*, no asegura que sea un eficiente agente de biocontrol. En primer lugar, la bacteria tiene que ser una buena colonizadora de la rizosfera. Muchas especies producen antibióticos pero eso no es suficiente para ejercer biocontrol, como ocurre en el caso de mutantes defectivos en la colonización de ápices radiculares de *Pseudomonas chlororaphis* (Chin-A-Woeng y col., 2000). Por otra parte, la síntesis de estos compuestos químicos varía en función de los cambios ambientales, como por ejemplo, fluctuaciones en las fuentes de carbono. Pero además, la producción de antibióticos en *Pseudomonas*, está regulada positivamente y a nivel post-traducciona por el sistema de dos componentes GacA/GacS. Las mutaciones en estos genes son muy comunes cuando la bacteria está colonizando la rizosfera, lo que supone una inestabilidad en la generación de antibióticos (Duffy y Défago, 1999). Por este motivo, las cepas de *Pseudomonas* afectadas en este sistema de dos componentes, se han descrito como peores agentes de biocontrol con respecto a las cepas silvestres (Heeb y Haas, 2001; Ligon y col., 2000).

### **Competencia por espacio y nutrientes**

Como se ha comentado anteriormente, para su desarrollo y crecimiento, todos los microorganismos asentados en la rizosfera, dependen de los exudados radiculares. Esto supone que va a tener lugar una fuerte competición por los nutrientes (carbono, nitrógeno, hierro, etc.) entre las cepas con actividad de biocontrol y el resto de microflora endógena.

Además, pequeñas zonas de la superficie de la raíz donde las concentraciones de micronutrientes son elevadas, como los lugares de generación de raíces secundarias y los espacios entre células epidérmicas (Bowen y Rovira, 1976; Bloemberg y col., 1997), atraen a todo tipo de organismos. Las bacterias que realizan control biológico ya establecidas o las que presentan una colonización agresiva y eficiente, pueden evitar el establecimiento de fitopatógenos, impidiendo el desarrollo de la enfermedad. La falta de éxito del patógeno en el proceso de competición para ocupar una zona determinada o para captar alimento, deriva en la exclusión de nicho. Como consecuencia, la habilidad de las PGPRs para establecerse en lugares clave de la raíz y competir de forma rápida por los nutrientes es considerado un mecanismo de biocontrol (Chin-A-Woeng y col., 2003).

Ya se ha estudiado como cepas de *Pseudomonas* que son capaces de colonizar eficientemente la raíz, controlan a hongos patógenos por este tipo de mecanismo. En el trabajo de Pliego y col. (2007) se seleccionaron bacterias que eran excelentes colonizadoras de la raíz de aguacate y se determinó si podían atenuar el efecto del fitopatógeno *Rosellinia necatrix*. Dos de los aislados, *P. putida* AV0102 y *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110, mostraron una importante protección frente a la podredumbre blanca de la raíz. Kamilova y col., (2005) demostraron que un mutante espontáneo de *P. fluorescens* PCL1751, afectado en la movilidad y en la colonización competitiva de la rizosfera, presentaba mermada su capacidad para controlar a *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, con respecto a la cepa silvestre.

En lo referente a la competición por micronutrientes, lo más estudiado ha sido la limitación por hierro. Este elemento es requerido por los organismos para su crecimiento debido a su papel esencial como cofactor, pero la solubilización de este nutriente es complicada porque la mayor parte de los suelos son neutros o alcalinos, habiendo muy poco  $\text{Fe}^{3+}$  disponible. Muchas bacterias, incluidas las *Pseudomonas*, tienen la habilidad de producir pequeñas moléculas con alta afinidad por el hierro, llamadas sideróforos, cuando las concentraciones del micronutriente son limitantes (su síntesis se reprime cuando hay altas concentraciones de hierro en el medio). Los sideróforos capturan el hierro, y el complejo sideróforo- $\text{Fe}^{3+}$  es reconocido por receptores de membrana específicos. En el interior de la célula bacteriana tiene lugar la reducción a  $\text{Fe}^{2+}$ . En el contexto de control biológico, la competición por hierro implica que los sideróforos producidos por las cepas de *Pseudomonas* tienen más afinidad para secuestrar el ión que los producidos por los fitopatógenos, lo que implica la no disponibilidad del micronutriente para estos últimos (Lemanceau y col., 1992;

Loper y Henkels, 1999). Los sideróforos más comunes producidos por especies de *Pseudomonas* son pioverdina, pseudobactina, ferribactina y pioquelina.

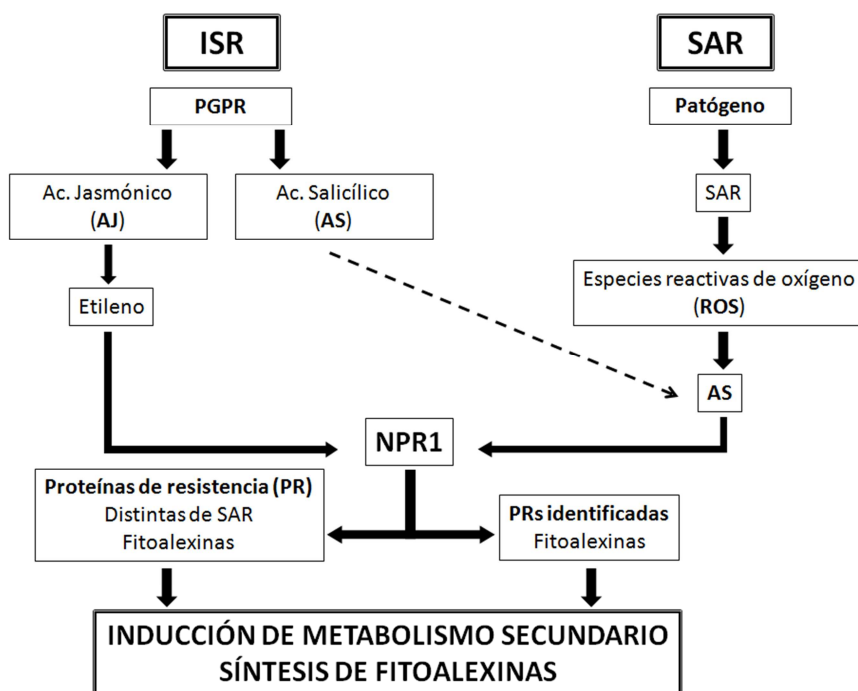
Ya se ha demostrado la implicación de los sideróforos de *Pseudomonas* en la supresión de enfermedades en las plantas. Un ejemplo es el trabajo de Raaijmakers y col. (1995) en el que se pone de manifiesto como mutantes de *P. putida* WCS358 defectivos en la biosíntesis de sideróforos (*sid*<sup>-</sup>), no reducen los síntomas de enfermedad causada por *F. oxysporum* en rábano, mientras que la cepa silvestre los disminuye en casi un 30%. Posteriormente se describió la importancia de la pioverdina sintetizada por *P. aeruginosa* 7NSK2 en la supresión del *damping-off* generado en tomate por especies de *Pythium* (Buysens y col., 1996). Sin embargo, existen trabajos que estudian otros patosistemas y concluyen que los sideróforos no juegan un papel fundamental en la reducción de las enfermedades analizadas (Kraus y Loper, 1992; Ongena y col., 1999; Thomashow y Weller, 1990).

### **Resistencia sistémica inducida**

Otras de las habilidades de las PGPRs definidas como agentes de biocontrol, es la inducción de mecanismos de defensa en la planta. Cuando las plantas son estimuladas apropiadamente, por medio de estímulos químicos o bióticos, desarrollan un estado en el que se incrementan las capacidades defensivas y que es denominado resistencia sistémica inducida o ISR (del inglés *Induced Systemic Resistance*) (Van Loon y col., 1998). En el año 91, dos grupos diferentes e independientes descubrieron un nuevo modo de supresión de enfermedades en plantas mediado por PGPRs (Van Peer y col., 1991; Wei y col., 1991) en dos patosistemas distintos: *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*-clavel y *Collectotrichum orbiculare*-pepino. Lo novedoso del ensayo fue que la inoculación del fitopatógeno y la bacteria se hizo en sitios distantes de la planta (hojas y raíz, respectivamente), para descartar control biológico por interacción directa.

Fenotípicamente, no se detectan diferencias entre ISR o SAR (del inglés *Systemic Acquired Resistance*) y ambas rutas convergen a nivel de la proteína NPR1 (Fig 1.3). Sin embargo, la SAR se dispara como consecuencia del ataque de un fitopatógeno y es dependiente de la acumulación endógena de ácido salicílico (AS) (Sticher y col., 1997). De hecho, plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresaban constitutivamente el gen *nahG* (que codifica para la salicilato hidroxilasa) de *P. putida*, eran incapaces de acumular AS y por tanto, estaban afectadas en SAR (Gaffney y col., 1993). Por otro lado, la ISR es dependiente de vías de señalización en las que están implicados el etileno y el ácido jasmónico (AJ). Ensayos realizados con mutantes de *A. thaliana*, afectados en la respuesta al etileno o AJ, puso de

manifiesto la necesidad de que estas respuestas estuvieran intactas en la planta para que se activara la ISR (Pieterse y col., 1998). Trabajos más recientes sugieren que cuando ambas respuestas defensivas son activadas simultáneamente, aumenta la supresión de la enfermedad de la planta (Van Wees y col., 2000) (Fig. 1.3).

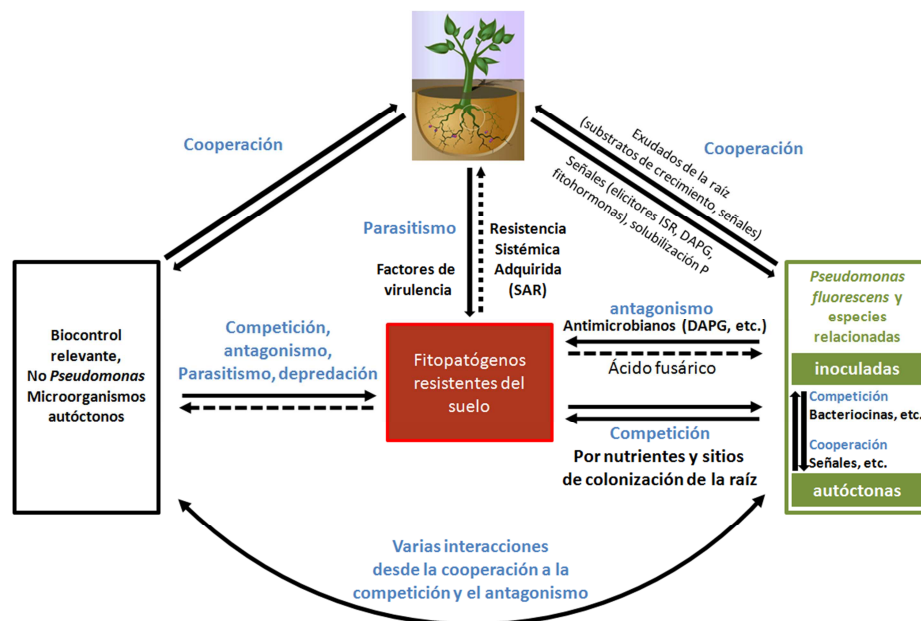


**Fig. 1.3:** Rutas de transducción de señales en la ISR y la SAR. Ambos mecanismos convergen en la activación de la proteína NPR1, aunque su expresión puede desencadenar la expresión de distintos genes. El ácido salicílico (AS) participa en ambos mecanismos. Modificado de Pieterse y col. (1998).

Algunas *Pseudomonas* tienen la capacidad de inducir el estado de resistencia sistémica en la planta, de hecho, existen diferentes trabajos que ponen de manifiesto esta capacidad para controlar un amplio rango de patógenos del suelo, incluidos virus, bacterias y hongos, vía ISR (revisado por Bakker y col., 2007). Los “elicitors” son sustancias de muy diversos tipos que activan las respuestas de defensa en la planta. En el caso de las *Pseudomonas*, se han caracterizado determinantes bacterianos que son responsables de que se desencadene la ISR. Las bacterias, incluidas las *Pseudomonas*, producen ácido salicílico como intermediario en el proceso de biosíntesis de sideróforos. El AS ha sido sugerido como un posible generador de la resistencia sistémica inducida (Leeman y col., 1996; Maurhofer y col., 1998; Audenaert y col., 2002), y las rizobacterias que lo sintetizan activan la ISR por una vía independiente de AJ y etileno. Otro de los determinantes bacterianos de las *Pseudomonas* mediadores de la ISR es la flagelina (Gómez-Gómez y Boller, 2000; Zipfel y col., 2004), principal componente del flagelo,

aunque no parece ser el “elicitador” más importante en este género de bacterias (Meziane y col., 2005). Los lipopolisacáridos de la pared de las bacterias Gram negativas (LPS), también son conocidos como estimuladores de ISR (Meziane y col., 2005). En el estudio de Van Peer y Schippers (1992), tanto la inoculación con células vivas de *P. fluorescens* WCS417, como la aplicación de la bacteria lisada o el LPS purificado, desencadenaron respuestas de defensa en clavel frente al ataque de *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*. También se han definido como determinantes bacterianos de este tipo, los sideróforos (Leeman y col., 1996; Ran y col., 2005), las homoserin-lactonas (Schuhegger y col., 2006) y los antibióticos. En concreto, recientemente se ha demostrado como el DAPG puede desencadenar la ISR (Iavicoli y col., 2003; Weller y col., 2004). Iavicoli y col. (2003) comprobaron por un lado, como el DAPG purificado activaba la ISR, y por otro, como mutantes de *P. fluorescens* CHAO en la biosíntesis de este antibiótico, eran incapaces de inducir resistencia.

La siguiente figura trata de exponer, relacionar y resumir todos los mecanismos y posibles interacciones que se establecen entre las PGPRs con capacidad de biocontrol, la planta y el organismo fitopatógeno (Fig. 1.4).



**Fig. 1.4:** Visión general de los mecanismos de protección de plantas por los agentes de biocontrol, concretamente, *P. fluorescens* y especies estrechamente relacionadas. Estas *Pseudomonas* pueden actuar directamente sobre la planta, a través de señales (DAPG, fitohormonas...) y/o mediante la activación de la ISR. La planta las atrae mediante señales moleculares y las proporciona exudados orgánicos. La inhibición del fitopatógeno también puede darse mediante competencia y/o por medio de procesos de antagonismo mediados por metabolitos secundarios como DAPG. Además, todos estos efectos están modulados por la acción de otros miembros de la comunidad bacteriana que pueden actuar de forma directa e indirecta en los efectos de control biológico y/o interferir con la actividad de los agentes de biocontrol. Obtenido de Couillerot y col. (2009).

## 5. PSEUDOMONAS Y *Pseudomonas fluorescens* F113

Uno de los linajes más amplio y diversificado fisiológicamente del dominio Bacteria, está constituido por las “bacterias rojas”, también llamadas *Proteobacterias*, el cual comprende cinco subdivisiones: *alfa*, *beta*, *gamma*, *delta* y *épsilon*. Muchos de los organismos que lo componen son fotoautótrofos, por lo que se sugirió un antecesor común de este tipo, pero también existen *Proteobacterias* que evolucionaron hacia otras estrategias de producción de energía, como la quimiolitotrofía o la quimioorganotrofía, que les permitió colonizar nuevos nichos ecológicos, como el suelo o la superficie de las plantas, donde la fotosíntesis anoxigénica no presenta ninguna ventaja.

El subgrupo de las *Pseudomonas* fluorescentes se incluye dentro de la familia *Pseudomonadaceae* (Winslow y col., 1917), que a su vez pertenece a la subdivisión de las *gamma-Proteobacterias*. Todos los grupos que componen este género, se caracterizan por ser bacilos rectos o ligeramente curvados, con un diámetro de 0.5-1  $\mu\text{m}$  y una longitud de 1.5-5  $\mu\text{m}$ , que presentan flagelación de tipo polar (con uno o varios flagelos), excepto en algunas especies donde sí se pueden detectar también flagelos laterales de menor tamaño. Las *Pseudomonas* son un grupo importante de bacterias Gram negativas, que también se caracterizan por no formar esporas, no presentar vainas, ni apéndices.

En lo referente a su metabolismo, la mayoría son quimioorganotróficos aeróbicos que oxidan compuestos orgánicos de bajo peso molecular para la obtención de energía. En algunos casos, pueden ser quimiolitotróficos usando  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}$  como únicos donadores de electrones; y en otros, utilizan nitrato como aceptor de electrones en condiciones de anaerobiosis, como se ha descrito para *P. aeruginosa* (Vander Wauven y col., 1984). Pero resulta interesante resaltar la gran variedad de compuestos orgánicos que son capaces de usar como fuente de carbono, que en algunos casos pueden ser más de cien. Nutricionalmente, se caracterizan por presentar numerosos operones inducibles como consecuencia del requerimiento de distintas enzimas para catabolizar sustratos orgánicos poco corrientes.

El subgrupo de las *Pseudomonas* fluorescentes incluye especies de *P. aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*..., y su inclusión en este grupo se debe a la producción de pigmentos fluorescentes amarillo-verde, que se excitan a longitudes de onda bajas. Dentro de estas especies, se pueden distinguir algunas que son patogénicas, tanto de animales como de plantas, como es el caso de *P. aeruginosa* y *P.*

*syringae*, y otras que se incluyen dentro de aquellas que establecen interacciones beneficiosas con las plantas formando parte de su rizosfera, como *P. putida*, *P. chlororaphis* y *P. fluorescens*.

*P. fluorescens* F113 es la cepa con la que se está trabajando en nuestro laboratorio y con la que hemos realizado los estudios que forman parte de esta memoria. Fue aislada por primera vez de la rizosfera de remolacha (*Beta vulgaris*) en Irlanda (Shanahan y col., 1992), aunque en estudios posteriores se ha descrito como una colonizadora competente de otras plantas de gran interés en la agricultura, como por ejemplo, el guisante (*Pisum sativum*) (Naseby y Lynch, 1999), el tomate (*Lycopersicum esculentum*) (Dekkers y col., 2000; Simons y col., 1996), el sauce (*Salix viminalis*) y la alfalfa (*Medicago sativa*) (Villacieros, 2003; Villacieros y col., 2005).

*P. fluorescens* F113 es una PGPR con capacidad de biocontrol de patógenos de plantas (Shanahan y col., 1992) debido a que produce metabolitos secundarios con propiedades antibióticas y antifúngicas, por lo que se han realizado liberaciones voluntarias en campo de esta estirpe (Moenne-Loccoz y col., 2001). Concretamente, *P. fluorescens* F113, sintetiza y libera DAPG, enormemente efectivo frente a enfermedades generadas por hongos fitopatógenos, como es el caso del *black root-rot* en tabaco (Keel y col., 1992) y el *damping-off* en la remolacha (Fenton y col., 1992).

Tanto por ser una excelente colonizadora competente de la rizosfera, como por otras características mencionadas con anterioridad, se consideró la utilización de esta cepa en biorremediación. Como ya hemos apuntado, se han construido cepas modificadas genéticamente de *P. fluorescens* F113 que contienen los genes *bph* integrados en el cromosoma (*P. fluorescens* F113pcb), permitiéndola cometabolizar algunos bifenilos policlorados (PCBs) (Brazil y col., 1995; Karlson y col., 1998; Villacieros y col., 2005). De hecho, se han estudiado los cambios que puede generar este OMG en las poblaciones de bacterias existentes en la rizosfera, así como sus fluctuaciones a lo largo del tiempo por medio de técnicas de TGGE (del inglés *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) (Aguirre de Cárcer y col., 2007a; Aguirre de Cárcer y col., 2007b).

## 6. COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA

Para que la introducción de microorganismos efectivos en un sistema agrícola tenga éxito, se requiere en primer lugar, el establecimiento de la bacteria en la rizosfera, y posteriormente, la proliferación y la actividad de estos inoculantes bajo unas condiciones

ambientales determinadas (Sorensen y col., 2001). No obstante, la aplicación de PGPRs no siempre conduce a la persistencia de las mismas. Esto puede ser consecuencia de varios factores, pero la principal causa se debe a las limitaciones que puede ofrecer un suelo, lo que derivaría en una baja actividad metabólica de los microorganismos, y por tanto, en una menor capacidad de ejercer su función como PGPR. Por tanto, una colonización exitosa de un suelo determinado va a depender de un delicado balance entre factores bióticos: planta, otras PGPRs, otros microorganismos..., y abióticos: tipo de suelo y contenido en agua y minerales, pH, temperatura, composición de los exudados radicales... Resulta entonces fundamental conocer estos factores y como afectan a los inoculantes para conseguir una aplicación óptima (Thomashow, 1996).

La colonización de la rizosfera es el primer paso en el establecimiento de la interacción beneficiosa planta-bacteria (Mercado-Blanco y Bakker, 2007). Se define como el modo natural de distribución de los microorganismos y tiene lugar de forma heterogénea. Una eficiente colonización de la rizosfera es la característica principal que ha de mostrar una bacteria para ser PGPR, de hecho, una inadecuada colonización implica menor capacidad en el control biológico (Schippers y col., 1987). En el trabajo de Bull y col., (1991) se demuestra que existe una relación positiva entre el tamaño de la población de *P. fluorescens* 2-79RN<sub>10</sub> asentada en la raíz seminal de las plantas de trigo y el grado de disminución de las lesiones causadas por el fitopatógeno *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*.

A lo largo de los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten la localización de los microorganismos en la raíz de forma directa. La mayoría son herramientas que ayudan a la detección y estudio de la población general existente, pero otras permiten el análisis de cepas bacterianas concretas. Si estas cepas carecen de marcaje, los experimentos se centran en el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen a carbohidratos o proteínas específicas de la superficie de la célula bacteriana (Hansen y col., 1997). Estos autores utilizaron dos anticuerpos policlonales DF57 y Ag1, que reconocen dos cepas de *P. fluorescens*, y mediante microscopía de laser confocal, pudieron detectar y estudiar el patrón de colonización en raíces de cebada de ambas cepas al mismo tiempo. También se ha hecho uso de anticuerpos con marcajes de fluorescencia para detectar a las bacterias en la raíz, en este caso, utilizando microscopía de fluorescencia (Kragelund y Nybroe, 1996), aunque son métodos que no permiten diferenciar células vivas de muertas, ya que los anticuerpos se unen a moléculas de superficie. Este problema se solucionó aplicando técnicas de hibridación fluorescente *in situ* o FISH (del inglés *Fluorescence In Situ Hybridization*). Las sondas



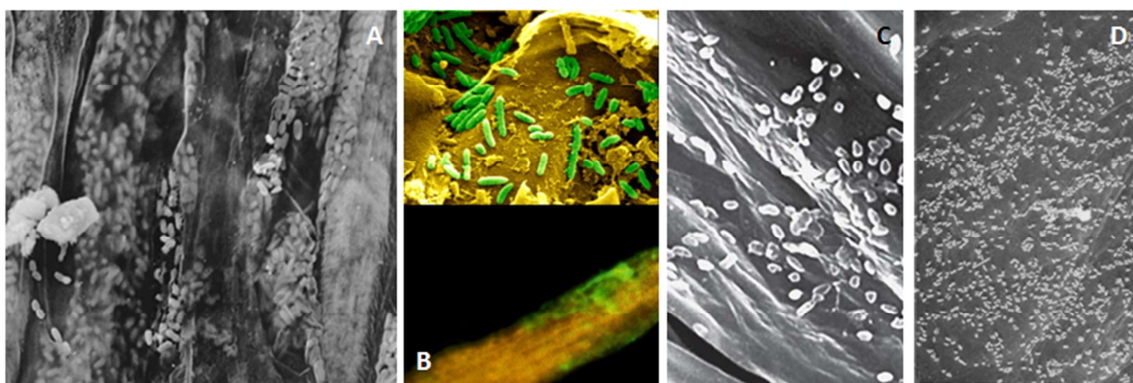
fluorescentes de oligonucleótidos construidas a partir de secuencias de ARN ribosómico 16S, hibridan con secuencias específicas de ARNr 16S presente en las células bacterianas previamente fijadas. De este modo, y a diferencia de otras herramientas, es posible identificar, localizar y cuantificar bacterias *in situ*. En este sentido resulta interesante el trabajo de Watt y col. (2006), en el cual, utilizando FISH determinan la distribución de *Pseudomonas* y bacterias filamentosas en la rizosfera, visualizando la formación de agregados tipo microcolonias en la mayor parte de la superficie radicular.

El modo de disposición de las bacterias cuando se asientan en las raíces varía considerablemente en función de la cepa bacteriana, e incluso en el tipo de planta que se esté colonizando (Poonguzhali y col., 2008). No obstante, lo que sí parece una característica común a todas las PGPRs es la carencia de homogeneidad a la hora de establecerse en la rizosfera. Parece razonable que aquellas zonas donde abunda el alimento, es decir, donde se acumulan las rizodeposiciones, estén más pobladas (Rovira, 1973). De hecho, Rudrappa y col. (2008) afirman que las bacterias comienzan a colonizar aquellas zonas donde la exudación es mayor y posteriormente empiezan a agregarse. En las zonas con mayor concentración de nutrientes se pueden llegar a formar densas biopelículas, mientras que en regiones con limitación de exudados, como el ápice, estas matrices maduras complejas estarán menos desarrolladas.

### **6.1. Colonización de la rizosfera por *Pseudomonas***

Las *Pseudomonas* comprenden un grupo de rizobacterias que se caracterizan por presentar un crecimiento rápido y un metabolismo muy versátil, idóneas por tanto para ser utilizadas como inoculantes en agricultura. Por este motivo, se ha hecho hincapié en conocer los patrones de colonización de la rizosfera, de hecho, existen varios trabajos en los que hacen descripciones muy exhaustivas de este proceso. La cepa con capacidad de biocontrol *P. fluorescens* WCS365 se caracteriza por formar microcolonias, principalmente en la base de la raíz de tomate en las primeras horas de colonización. La mayor parte de estos agregados se concentran entre las células epidérmicas radiculares, y en menor número en la superficie de éstas; pero en cualquier caso están envueltos por una capa mucoide de origen vegetal. Con respecto al ápice, las bacterias aparecen individualmente, pero conforme pasan los días, se van detectando estructuras de tipo microcolonias (Chin-A-Woeng y col., 1997) (Fig. 1.5A). Este patrón de colonización espacio temporal se observó también para *P. fluorescens* CHAO (Chin-A-Woeng y col., 1997) y *P. fluorescens* F113 (Barahona y col., 2010; Chin-A-Woeng y col., 1997; Villacieros y col., 2003) (Fig. 1.5B). Los agregados de células bacterianas a lo largo del rizoplaneo también son visibles cuando *P. fluorescens* 2-79RN<sub>10</sub> se asienta en las raíces de guisante

(Dandurand y col., 1997), siendo prácticamente inexistentes en el ápice (Fig. 1.5C). Patrones idénticos se observaron para *P. fluorescens* A6RI: ápices desprovistos de bacterias y microcolonias que aumentaban de tamaño conforme se asciende en la raíz (Gamalero y col., 2005) (Fig. 1.5D). Esto concuerda con los datos publicados por Lugtenberg y col. (2001), dónde explican que en las zonas más alejadas de la base de la raíz es común encontrar muy pocas bacterias y dispuestas individualmente. Durante la colonización de la rizosfera de cebada por *P. fluorescens* se observan (1) células aisladas en los pelos radicales, (2) formando hileras de agregados a lo largo del rizoplasma de la raíz principal y (3) bacterias embebidas en el mucigel sintetizado por la planta (Hansen y col., 1997).



**Fig. 1.5:** Visualización mediante microscopía electrónica de barrido de la colonización de la rizosfera por distintas especies de *Pseudomonas*. **A.** Colonización de la rizosfera por *P. fluorescens* WCS365 (Chin-A-Woeng y col., 1997). **B.** Colonización de la rizosfera por *P. fluorescens* F113 (Barahona y col., 2010, Villaciers y col., 2003). **C.** Colonización de la rizosfera por *P. fluorescens* 2-79RN<sub>10</sub> (Dandurand y col., 1997). **D.** Colonización de la rizosfera por *P. fluorescens* A6RI (Gamalero y col., 2005). En todos los casos se observa un patrón similar en la colonización, ya que las células están aisladas o se agrupan formando microcolonias.

## 6.2. Factores y genes implicados en la colonización de la rizosfera

Se han desarrollado varios abordajes para dilucidar caracteres y genes que pudiesen estar implicados en la colonización de la rizosfera. Una de las primeras estrategias consistía en el aislamiento de mutantes en rasgos que pudieran estar relacionados con el proceso de colonización para posteriormente probar sus habilidades comparándolas con las de la cepa silvestre (de Weger y col., 1987; Dekkers y col., 1998a; Scher y col., 1988; Simons y col., 1996; Vesper, 1987). Otro método muy extendido para emprender la búsqueda sistemática de mutantes afectados en la colonización de la rizosfera, es la mutagénesis al azar por transposición, que permite a posteriori, identificar el gen o carácter afectado (Dekkers y col., 1998b; Lugtenberg y col., 2001; Lam y col., 1990). Una de las herramientas más revolucionarias fue el análisis a gran escala de promotores que se expresan en una condición determinada,

denominada IVET (del inglés *In Vivo Expression Technology*) (Mahan y col., 1993), que permite identificar genes que se inducen específicamente en el proceso de colonización de la rizosfera (Barr y col., 2008; Gal y col., 2003; Rainey, 1999; Ramos-González y col., 2005; Rediers y col., 2003) (Tabla 1.1). En los últimos años, se han publicado trabajos donde se analizan los perfiles transcriptómicos de cepas de *Pseudomonas* en el momento que están colonizando la raíz. Mediante *microarrays* se han detectado genes que se inducen transcripcionalmente y que anteriormente se desconocía que fueran relevantes en este proceso (Mark y col., 2005; Matilla y col., 2007).

**Tabla 1.1:** Genes de *Pseudomonas* inducidos durante colonización de la rizosfera.

Clasificación	Gen(es)	Función	Referencia
Estructura	<i>fliO</i>	Aparato de exportación flagelar	(Ramos-González y col., 2005)
Superficie celular	<i>algD</i>	Biosíntesis del exopolisacárido alginato	(Ramos-González y col., 2005)
	<i>algA</i>	Biosíntesis del exopolisacárido alginato	(Boch y col., 2002)
	<i>secB</i>	Chaperona de ruta de secreción	(Ramos-González y col., 2005)
	<i>yidC</i>	Inserción de proteínas en la membrana	(Ramos-González y col., 2005)
Reguladores	<i>colS/colR</i>	Sistema de dos componentes	(Ramos-González y col., 2005)
	<i>copR/copS</i>	Sistema de dos componentes implicados en resistencia al cobre	(Rainey, 1999)
	<i>wspE</i>	Regulador quimiotaxis; síntesis de celulosa	(Marco y col., 2005)
Adquisición de nutrientes y metabolismo	<i>hutT</i>	Permeasa inducible por histidina	(Rainey, 1999)
	<i>braE-braD</i>	Parte de permeasa para transporte de aminoácidos ramificados	(Rainey, 1999)
	<i>xylA</i>	Xilosa isomerasa	(Rainey, 1999)
	<i>morB, ncr</i>	Reductasa implicada en utilización de compuestos nitrogenados complejos	(Rainey, 1999)
	<i>gnd</i>	6-fosfogluconato deshidrogenada (ruta pentosas fosfato)	(Ramos-González y col., 2005)
	<i>aceE</i>	Componente E1 de la piruvato deshidrogenada (metabolismo central)	(Ramos-González y col., 2005)
	<i>ssuE</i>	Reductasa FMN dependiente de NAD(P)H; metabolismo del azufre	(Marco y col., 2005)
	pUIVS2	Transportador tipo ABC; posible captación de compuestos	(Lee y Cooksey, 2000)

	<i>oprD2</i>	Posible porina de membrana externa; posible captación de compuestos	(Lee y Cooksey, 2000)
Defensa bacteriana y virulencia	<i>ragC</i>	Miembro de la familia AcrB/AcrD/AcrF de bombas de extrusión	(Rainey, 1999)
	<i>rosA</i>	Proteína transmembrana; resistencia a fosmidomicina	(Rainey, 1999)
	<i>syrE</i>	Siringomicina sintetasa	(Boch y col., 2002; Marco y col., 2005)
	<i>sylE</i>	Posible transportador de siringolina A	(Marco y col., 2005)
	varios genes	Sistema de secreción tipo III	(Boch y col., 2002)
Reordenamiento ADN	<i>sss/xerD</i>	Recombinasas específicas de sitio de la familia de las lambda integrasas	(Marco y col., 2003; Marco y col., 2005; Martínez-Granero y col., 2005)
	<i>orfC</i>	Elemento de inserción ISI50	(Marco y col., 2005)

---

### 6.2.1. Quimiotaxis y Movilidad

Los flagelos bacterianos son orgánulos filamentosos que permiten la locomoción de la célula. Sin duda, esta estructura ha sido la mejor estudiada en relación con la movilidad procariota (Aldridge y Hughes, 2002; Macnab, 1999). De hecho, la movilidad se ha descrito como uno de los factores más importantes para que una bacteria sea una colonizadora competente de la rizosfera. Las bacterias pueden desarrollar dos tipos de movimientos dependientes de flagelo: *swimming* y *swarming*. El primero implica el uso de flagelos polares y el movimiento se realiza en un medio líquido; mientras que en la movilidad tipo *swarming* intervienen normalmente los flagelos peritricos que hacen que la bacteria sea capaz de moverse sobre superficies sólidas o en ambientes viscosos (Harshey, 1994). Ambas clases de movilidad han sido exhaustivamente estudiadas *in vitro*, pero también se conoce que son algunos de los movimientos que las bacterias necesitan para colonizar las raíces de las plantas.

A finales de los años 80 y principios de los años 90, comienzan a desarrollarse varios estudios para intentar dilucidar el papel de la movilidad bacteriana en la colonización de la rizosfera. En primer lugar, Howie y col. (1987) demostraron cómo tres mutantes inmóviles de distintas especies de *P. fluorescens*, colonizaban la raíz de trigo y suprimían el *take-all* del mismo modo que sus respectivas cepas parentales. Propusieron un modelo de colonización de la semilla en dos fases: una primera etapa en la que las bacterias, por transporte pasivo se desplazaban en dirección al crecimiento de la raíz, y una segunda en la que procedían a la

colonización de los nichos mediante multiplicación. La no relación entre colonización de la rizosfera y movilidad también se determinó en ensayos con el sistema *P. putida*/soja (Scher y col., 1988). En contraposición, es importante mencionar el completo trabajo de de Weger y col. (1987), donde tras comprobar que las alteraciones genéticas de cuatro mutantes de *P. fluorescens* WCS374 carentes de flagelo no conducían a efectos pleiotrópicos, se analizó la capacidad de colonización de la raíz. Todas las cepas mostraron mermada esta capacidad con respecto a la cepa parental, y las diferencias en colonización eran más patentes conforme se estudiaban partes más distales al sitio de inoculación.

A partir de este momento, surgen continuamente trabajos que confirman el papel clave que juegan los flagelos, y más concretamente la movilidad tipo *swimming*, durante las primeras fases de colonización de la rizosfera. La estrategia de utilizar mutantes inmóviles o con movilidad reducida da resultados muy similares, ya que estas bacterias presentan dificultades para colonizar los ápices radiculares (Capdevila y col., 2004; Chin-A-Woeng y col., 2000; Dekkers y col., 1998b; Simons y col., 1996). Otras investigaciones se centran en averiguar qué ocurre con aquellas cepas que presentan fenotipos muy móviles con respecto a las parentales. Kamilova y col. (2005) utilizaron el método de selección de parejas planta/ bacteria descrito anteriormente por Kuiper y col. (2001), para rescatar de los ápices radiculares las colonizadoras más rápidas. El incremento de la movilidad de algunas cepas puede estar ligado al fenómeno de variación de fase. Los variantes fenotípicos suelen presentar hipermovilidad y se ha visto que se recuperan de la rizosfera cuando únicamente se ha inoculado la cepa silvestre. Por este motivo, se investigó también la capacidad de colonizar la rizosfera de estos variantes. Concretamente, en *P. fluorescens* F113, se observó que tres de estos mutantes naturales aislados, desplazan a la cepa silvestre cuando se inoculan conjuntamente en la raíz de alfalfa (Martínez-Granero y col., 2006). Con anterioridad, detectaron que los variantes fenotípicos de *P. fluorescens* F113 aislados de la rizosfera, colonizaban las zonas más alejadas de la raíz (Sánchez-Contreras y col., 2002), lo que se confirmó posteriormente en *P. brassicacearum* mediante estudios de microscopía confocal. Los variantes de esta cepa se localizaban preferentemente en ápices de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, todo lo contrario a lo que ocurría con la cepa silvestre, que colonizaba en mayor medida la base radicular (Achouak y col., 2004). También, se ha observado que mutantes en genes que reprimen la movilidad en *P. fluorescens* F113 son mejores colonizadores de los ápices que la cepa parental (Barahona y col., 2011).

El que la bacteria se mueva no es un fenómeno aleatorio, sino que está ligado a la movilidad quimiotáctica. El mecanismo de quimiotaxis es bastante complejo e implica muchas proteínas diferentes. La proteína sensora o MCP (del inglés *Chemoreceptor-Methyl-Accepting Chemotaxis Protein*), que forma parte de un sistema de dos componentes, es la encargada de recibir la señal ambiental que hace que el microorganismo se mueva en distintas direcciones en función de si el compuesto detectado es un atrayente o un repelente. En el tema que nos ocupa, los compuestos exudados por las raíces de las plantas juegan un papel fundamental, ya que van a ser los encargados de atraer hacia la rizosfera a los microorganismos (de Weert y col., 2002; Gamliel y Katan, 1992; Gaworzewska y Carlile, 1982; Mark y col., 2005; Parke y col., 1987; Van de Broek y col., 1998). Aunque no todos los microorganismos responden igual a los distintos tipos de quimioatrayentes. En la literatura hay artículos que demuestran el efecto atrayente de los azúcares en cepas de *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium leguminosarum*, y *Agrobacterium tumefaciens* (Gaworzewska y Carlile, 1982; Loake y col., 1988; Okon y col., 1980). Sin embargo, en el caso de *P. fluorescens*, los ácidos orgánicos parecen ser los quimioatrayentes preferidos (de Weert y col., 2002).

Ya que parecía razonable pensar que el papel de la movilidad es que la bacteria consiga alcanzar las rizodeposiciones, de Weert y col. (2002) decidieron investigar si diferentes cepas de *P. fluorescens* (WCS365, F113, SBW25 y OE28.3) mostraban un comportamiento quimiotáctico hacia los exudados radiculares de tomate. Para ello, generaron para todos los casos, cepas mutantes en el gen *cheA* que codifica la quinasa sensora. Estas bacterias no quimiotácticas colonizaron de forma normal la rizosfera, pero en estudios de colonización competitiva con su respectiva cepa silvestre, estuvieron muy afectadas, lo que confirmó la importancia de la quimiotaxis. Para la bacteria patogénica *Ralstonia solanacearum* resulta imprescindible el efecto quimiotáctico de los exudados para que pueda llevar a cabo una eficiente colonización, ya que mutantes en *cheA* o *cheW* no son capaces de competir con la cepa silvestre (Yao y Allen, 2006). *R. leguminisarum* presenta un *cluster* de genes quimiotácticos que también regulan la movilidad tipo *swimming* de la bacteria, lo cual resulta esencial para la nodulación competitiva. Deleciones en cualquiera de los genes que conforman el *cluster* resultan en cepas muy afectadas en formación de nódulos, incluso cuando el número de células en la inoculación inicial era 10 veces mayor al de la cepa silvestre (Miller y col., 2007).

### 6.2.2. Metabolismo de exudados y auxotrofia

El nivel de capacidad que presenten los microorganismos de conseguir, utilizar y metabolizar los compuestos que se exudan por las raíces de las plantas resulta indispensable para definir el grado de colonización de la rizosfera. Por tanto, mutantes incapaces de producir algún tipo de aminoácido, se han descrito como cepas afectadas en la colonización de la rizosfera. En el trabajo de Simons y col. (1997), se confirma que la síntesis de aminoácidos es esencial para la colonización de la raíz de tomate por parte de *P. fluorescens* WCS365. En primer lugar, estiman que la concentración de aminoácidos procedente de los exudados no es suficiente para mantener las poblaciones microbianas asociadas a la raíz. Posteriormente, comprueban que mutantes auxótrofos para histidina, leucina, arginina, isoleucina, valina y triptófano no eran recuperados de los ápices radiculares de tomate, mientras que si se añadía el aminoácido pertinente al sistema, se restauraba el fenotipo silvestre. El mismo autor, en un estudio anterior, determina que la cantidad de vitaminas procedentes de las rizodeposiciones, no es suficiente para complementar el fenotipo de un mutante auxótrofo para la vitamina B1 (Simons y col., 1996). Del mismo modo ocurre para una cepa de *P. fluorescens* SBW25 que no sintetiza vitamina B5 y no coloniza eficientemente la rizosfera (Rainey, 1999).

No sólo la imposibilidad de sintetizar aminoácidos o vitaminas supone que la capacidad de colonizar la rizosfera se vea mermada. Las rizobacterias tienen que presentar intactas todas las rutas metabólicas que les van a permitir utilizar los exudados de la raíz, ya que éstos son las principales fuentes de carbono y energía para los microorganismos colonizadores. Como hemos comentado con anterioridad, las bacterias son responsables de que pueda cambiar el perfil de exudados de una planta (Dardanelli y col., 2009; Kamilova y col., 2006; Rovira y Campbell, 1975) e incluso, sintetizar ciertos metabolitos que inducen un incremento en la exudación (Volpin y col., 1996). En este sentido se intentó dilucidar qué fuentes de carbono y energía eran más relevantes para la colonización del agente de biocontrol *Enterobacter cloacae* 501R3 (Liu y col., 2007). Estos investigadores realizaron estudios de colonización competitiva de la raíz de pepino entre dos cepas de *E. cloacae* afectadas en algún proceso metabólico. Por un lado, el mutante A-11 (Roberts y col., 1999) presentaba una alteración en *pfkA*, lo que implicaba un crecimiento similar al de la cepa silvestre en presencia de una mezcla de exudados compuesto únicamente por aminoácidos y ácidos orgánicos, pero tenía problemas cuando en el medio había solo carbohidratos. Por otro, la cepa M2 (Liu y col., 2007), con mutación en el gen *sdhA*, que codifica para una subunidad de la succinato deshidrogenasa, presentaba un fenotipo inverso, desarrollándose con normalidad con

exudados exclusivamente de tipo azúcares. M2 resultó ser más competitiva en la colonización de la raíz, lo que implicaría que el catabolismo de carbohidratos es más importante que el de aminoácidos o ácidos orgánicos.

### **6.2.3. Lipopolisacáridos e integridad de membrana**

Las bacterias Gram negativas, además del peptidoglicano, poseen una capa adicional en su pared que está compuesta de lipopolisacárido o LPS, constituido por el lípido A, un núcleo o *core* y el antígeno-O. El antígeno-O podría estar implicado en los primeros pasos de la colonización, concretamente en la adhesión, además de en el establecimiento de ciertas relaciones simbióticas (Lerouge y Vanderleyden, 2002).

Entre todos los mutantes afectados en la colonización la raíz, los más frecuentes son los que disponen de alteraciones en su patrón de LPS, más concretamente, de antígeno-O. Se ha comprobado que estas cepas afectadas en la síntesis de las cadenas de azúcares que componen el antígeno-O, no son competentes a la hora de colonizar la rizosfera, ni de forma individual, ni cuando compiten con la estirpe silvestre. Los primeros estudios se realizaron con *P. fluorescens* WCS365 en plantas de tomate y patata (de Weger y col., 1989; Dekkers y col., 1998a; Simons y col., 1996). En un principio, este grupo de investigación no podía dar una respuesta clara al papel que tenía el antígeno-O en el proceso de colonización, porque normalmente, los mutantes con patrones cambiantes de LPS presentaban un menor crecimiento que la cepa silvestre en condiciones de laboratorio (Lugtenberg y col., 2001), hasta que detectaron la cepa mutante PCL1205, con la misma tasa de crecimiento que la estirpe silvestre pero incapaz de colonizar (Dekkers y col., 1998c). Mutantes en LPS de *Rhizobium tropici* generados por transposición también tienen mermadas sus habilidades colonizadoras. Concretamente, interrupciones en los genes *wzt* (codifica un transportador ABC) y *noeJ* (codifica una enzima que produce GDP-manosa), implican que las cepas carezcan de una eficiente colonización competitiva de la raíz de maíz (Ormeño-Orrillo y col., 2008). Estos autores apuntan a que este defecto puede ser debido a que los mutantes en LPS son sensibles a un compuesto antimicrobiano producido por la planta de maíz.

### **6.2.4. Adhesión**

Las rizobacterias, como consecuencia del efecto atrayente de los exudados, se desplazan hacia la raíz y cuando alcanzan la superficie, puede comenzar el proceso de adhesión, que generalmente conduce a la formación de microcolonias, e incluso biopelículas.



En la adhesión a superficies abióticas y bióticas, intervienen varios factores. Los mejores estudiados son los flagelos, algunas proteínas de membrana externa y los pili tipo IV.

Los flagelos (o la movilidad mediada por éstos) permiten a la célula alcanzar inicialmente la superficie que vaya a colonizar, ya que facilitan, por un lado, que la bacteria supere las fuerzas de tipo electrostático generadas, y por otro, que las células se vayan dispersando a lo largo de la superficie (Pratt y Kolter, 1998), hasta formar la primera monocapa bacteriana previa al establecimiento de las microcolonias (O' Toole y Kolter, 1998a). De hecho, mutantes en la movilidad dependiente de flagelos, no son capaces de desarrollar biopelículas maduras en superficies abióticas (O' Toole y Kolter, 1998b; Pratt y Kolter, 1998). Esto también ocurre en la adhesión a superficies vegetales como semillas, lo cual parece ser muy importante para una posterior colonización de la raíz (Espinosa- Urgel y col., 2000). En los trabajos de DeFlaun y col. (1990, 1994) queda patente que intervienen los mismos factores en la adhesión tanto a superficies abióticas como bióticas porque demostraron que mutantes aflagelados de *P. fluorescens* PfO-1 incapaces de adherirse a partículas de cuarzo, tampoco lo hacían a semillas de alfalfa. Tras ensayos de mutagénesis por transposición se aislaron mutantes de *P. putida* KT2440 que estaban afectados en la adhesión a semillas de maíz (Yousef- Coronado y col., 2008). Dos de los aislados presentaban la inserción en genes flagelares, y eran desplazados por la cepa silvestre en ensayos de colonización competitiva de la rizosfera. En la misma línea, se observó como un mutante de *P. fluorescens* F113 incapaz de sintetizar flagelina, presentaba una reducción del 50% en su capacidad de adhesión en relación a la cepa parental (Barahona y col., 2010). Por último, en un trabajo muy reciente en el que se caracteriza fisiológica y transcriptómicamente un mutante *fliA* en *P. putida* KT2440, se analiza cómo esta cepa inmóvil presenta problemas a la hora de adherirse a las semillas de maíz con respecto a la cepa silvestre (Rodríguez- Herva y col., 2010).

En la superficie bacteriana existen moléculas que van a permitir la adhesión de la célula, generalmente mediante el reconocimiento y la unión a algún carbohidrato. Estos componentes se denominan adhesinas, grandes proteínas que suelen presentar una estructura repetitiva. En el trabajo de Espinosa-Urgel y col., (2000) se llegó a la conclusión de que debían existir más factores implicados en los procesos de adhesión de *P. putida* que los hasta la fecha descritos (flagelos, pili...), que además podían ser comunes para la colonización de superficies abióticas y bióticas, y utilizados tanto en interacciones patogénicas como mutualistas. Este grupo de investigación ha caracterizado dos de estas proteínas en *P. putida* KT2440, LapA y LapF. LapA, la proteína más grande codificada por el genoma de esta cepa, juega un papel muy

importante en la adhesión a semillas (Espinosa- Urgel y col., 2000) y en la colonización de la rizosfera (Yousef- Coronado y col., 2008). LapF, que participa en el ensamblaje de la estructura tridimensional de una biopelícula, se ha descrito del mismo modo como involucrada en adhesión a semillas y en colonización de la raíz (Martínez-Gil y col., 2010). En esta línea resulta también interesante el trabajo de Torres y col. (2005), en el que demuestran que la adhesión a tejidos vegetales, a células humanas y a plásticos en *Escherichia coli* O157:H7 parece estar mediado por distintos paquetes de genes que conjuntamente codifican las adhesinas. Además, se pone de manifiesto la importancia de OmpA, porque una mutación en esta adhesina reduce la adhesión de la bacteria a semillas de alfalfa con respecto a la cepa silvestre.

En bacterias Gram negativas también se ha relacionado la capacidad de adhesión con los pili tipo I y tipo IV.

Las fimbrias o pili tipo I han sido caracterizados en varias cepas de *E. coli*, y su biogénesis depende del *cluster* de genes *fim*. Con la idea de analizar las bases genéticas de las primeras etapas de la formación de biopelículas en *E. coli*, Pratt y Kolter (1998) comprobaron la capacidad de adhesión a plásticos de mutantes en genes responsables de la síntesis de las fimbrias. Observaron cómo estas cepas no se adherían a superficies abióticas, determinando que la importancia de esta estructura radica en estabilizar la unión célula-superficie, y no en la adhesión inicial. En lo referente a la unión a superficies vegetales, se comprobó cómo conforme existe un incremento del número de pili tipo I en las células de *P. fluorescens* 2-79, aumenta la adhesión al sistema radicular de maíz (Vesper, 1987).

El *twitching* es un tipo de movilidad bacteriana independiente de flagelos, que ha sido muy bien estudiada en *P. aeruginosa* (Whitchurch y col., 1991). Se describe como un método para que las células bacterianas puedan desplazarse sobre superficies húmedas, que se caracteriza por llevarse a cabo mediante sacudidas cortas (Wall y Kaiser, 1999). Este tipo de movilidad depende de los pili tipo IV, los cuales han sido relacionados con la adhesión a superficies abióticas y vegetales. Algunos mutantes defectivos en la adhesión de *P. aeruginosa*, también denominados mutantes *sad* (del inglés *surface attachment defective*) (O'Toole y Kolter, 1998a), eran defectivos en la biogénesis del pili tipo IV. Cuando se analizó su fenotipo, se observó que eran capaces de desarrollar la monocapa inicial de células típica de los estadios tempranos de la formación de biopelículas, pero no pasaban de esta fase. Por tanto, estos pili juegan un importante papel en la adhesión inicial, y la movilidad tipo *twitching* permite el movimiento a lo largo de la superficie (O'Toole y Kolter, 1998b). Existen trabajos que documentan la presencia de pili tipo IV en bacterias fitopatógenas, ya que la adhesión es una

fase crucial en el proceso de infección. Este es el caso de *Xantomonas campestris* pv. *hyacinthi* y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, donde se ha observado que dichas estructuras facilitan la adhesión a hojas por parte de estas bacterias (Ojanen-Reuhs y col., 1997; Roine y col., 1998). Además, mutantes en *pilA* (carentes de pili tipo IV) del patógeno *R. solanacearum* tienen problemas para adherirse a las raíces de plantas de tomate, y por tanto, presentan disminuida su capacidad virulenta (Kang y col., 2002). Otro ejemplo es el de *Azoarcus* sp. BH72, que cuando infecta e invade a las plantas previamente se adhiere a los ápices radicales o a las raíces secundarias mediante los pili tipo IV. Pero en ensayos realizados con plantas de arroz, dobles mutantes *pilAB* de *Azoarcus* sp. BH72, fueron prácticamente incapaces de colonizar la raíz principal (Dörr y col., 1998). Resultados similares se obtuvieron para la PGPR *P. fluorescens* WCS365, porque tanto mutantes *pilA* como *pilT* (la mutación implica que el pili no se puede contraer) tienen ligeramente mermada su capacidad de colonizar los ápices de raíces de tomate (Lugtenberg y Bloemberg, 2004).

#### **6.2.5. Variación de fase**

El fenómeno de variación de fase o variación fenotípica (VF) se describe como un proceso que conduce a cambios fenotípicos a menudo reversibles, los cuales ocurren con alta frecuencia, y son consecuencia de mutaciones, reorganizaciones o modificaciones del ADN (Saunders y col., 2003). La VF no es un proceso extraño, sino que se ha descrito en muchas especies de bacterias, principalmente dentro de las Gram negativas (van den Broek y col., 2005), y tiene lugar para generar una mayor diversidad dentro de una población: aparecen subpoblaciones que permiten que se incremente la adaptación a un nicho concreto (Dybvig, 1993; Salaün y col., 2003; Saunders y col., 2003).

El trabajo de Dekkers y col. (1998b) es el primero donde se relaciona las recombinasas específicas de sitio con la capacidad de colonización competitiva de la rizosfera. Resultado de la mutagénesis por transposición de su cepa de estudio, *P. fluorescens* WCS365, obtuvieron un mutante deficiente en la colonización competitiva del ápice de la raíz de varias especies de plantas, pero que no estaba afectado en ninguno de los caracteres implicados en colonización de la rizosfera hasta ese momento estudiados. El gen interrumpido en esta cepa resultó ser un homólogo de *xerC* de *E.coli* y *sss* de *P.aeruginosa* (Höfte y col., 1994), genes que codifican recombinasas específicas de sitio de la familia  $\lambda$  integrasa, implicadas en la segregación del cromosoma (Sadowski, 1986).

Trabajos más recientes confirman cómo la VF juega un papel decisivo en la colonización de la rizosfera por parte de otras especies de *Pseudomonas*. Sánchez- Contreras y col. (2002) observaron cómo el fenómeno de variación de fase ocurre durante la colonización de la raíz. En este caso, se aislaron cepas de las raíces de alfalfa, las cuales formaban colonias que diferían morfológicamente de las de la cepa silvestre *P. fluorescens* F113, y aunque no se encontraron diferencias en colonización con respecto a la cepa parental, estos variantes fenotípicos presentaban mayor movilidad tipo *swimming* y *swarming* que F113, debido a la sobreproducción de flagelina. Además, cuando se inoculó en la raíz un mutante en *sss*, prácticamente no se generaban variantes fenotípicos, lo que significa que la recombinasa *Sss* es el factor más importante para producir VF en *P. fluorescens* F113. Resultados de este tipo se publicaron para *P. brassicacearum*, ya que los variantes fenotípicos hipermóviles aislados de la rizosfera de *A. thaliana*, se localizaron esencialmente en las raíces secundarias y en los ápices, mientras que la cepa parental ocupaba las zonas basales de la raíz (Achouak y col., 2004). Posteriormente, se descubrió que la recombinasa específica de sitio *XerD* también estaba implicada en el fenómeno de VF en *P. fluorescens* F113 (Martínez- Granero y col., 2005). En este trabajo se procedió a sobreexpresar *sss* y *xerD*, lo que resultó en un incremento substancial en la producción de variantes fenotípicos tanto en condiciones de cultivos de larga duración, como en experimentos de colonización de la rizosfera de alfalfa. Además, también se ha observado que estas recombinasas son capaces de inducirse en presencia de la planta, tanto en hoja (Marco y col., 2003; Marco y col., 2005), como en raíz (Martínez-Granero y col., 2005).

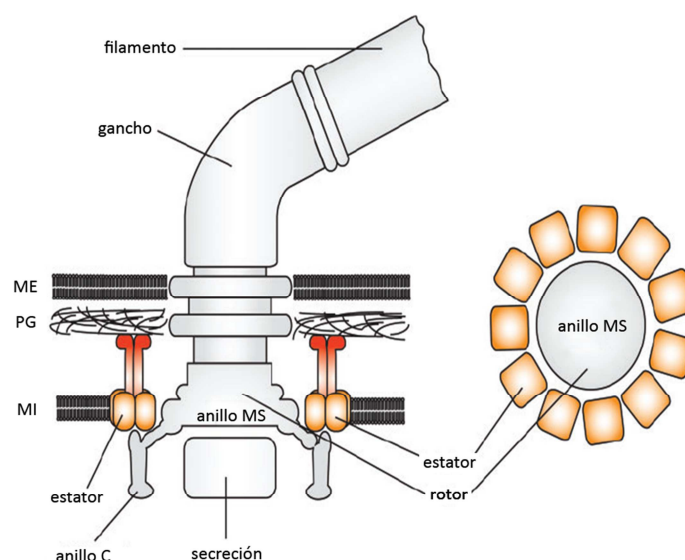
## **7. MOVILIDAD BACTERIANA DEPENDIENTE DE FLAGELOS Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS. METABOLISMO DEL di-GMPc EN LA CÉLULA**

### **7.1. Movilidad dependiente de flagelos**

La movilidad dependiente de flagelos está altamente extendida dentro del mundo bacteriano, sin embargo, el número, la localización y la estructura del aparato flagelar ha evolucionado de forma diferente en las distintas especies, hecho que refleja adaptaciones exclusivas en cada organismo. El flagelo es un orgánulo capaz de impulsar a la bacteria a través de medios líquidos (*swimming*), y de ambientes muy viscosos o a lo largo de superficies (*swarming*). Es interesante comentar que esta estructura está implicada en otros muchos procesos microbianos, como la adherencia a células huésped y su invasión, la secreción de proteínas y la formación de biopelículas, puntos que más tarde retomaremos (Mahajan y col.,

2009; Roy y col., 2009). Esta compleja maquinaria de rotación se compone de tres partes básicas: el cuerpo basal, el gancho y el filamento (Apel y Surette, 2008) (Fig. 1.6).

El cuerpo basal es la región de anclaje del flagelo en la célula, que además contiene el motor flagelar y un especializado sistema de secreción tipo III, imprescindible este último para la exportación de las proteínas flagelares. El cuerpo basal propiamente dicho está formado por el anillo MS (integrado en la membrana), el vástago (que atraviesa el espacio periplásmico), el anillo P (periplásmico) y el anillo L (situado en la membrana externa) (Macnab, 2003) (Fig. 1.6). El motor se divide en dos partes: (1) una parte estacionaria o estator, que convierte la energía generada por un gradiente electroquímico en energía cinética, y está compuesto por múltiples copias de MotA y MotB que se sitúan alrededor del cuerpo basal; (2) y una parte móvil o rotor, el cual se conecta con el gancho por medio del vástago. El rotor está constituido por varias copias de FliG, que junto con MotA/B son responsables de generar la fuerza de torsión (Lloyd y col., 1996). A continuación del cuerpo basal, se localiza el gancho, el cual tiene una función muy importante en la movilidad de la bacteria y está formado por monómeros de FlgE que se disponen formando alfa-hélices. La arquitectura de esta estructura posibilita que actúe como una bisagra flexible que es capaz de transmitir la fuerza de torsión, generada en el motor, sobre el filamento (Ferris y Minamino, 2006) (Fig. 1.6). La última parte del flagelo es el filamento, una larga hélice cilíndrica compuesta por hasta 20.000 subunidades de flagelina (FliC) (Macnab, 2003) (Fig. 1.6).



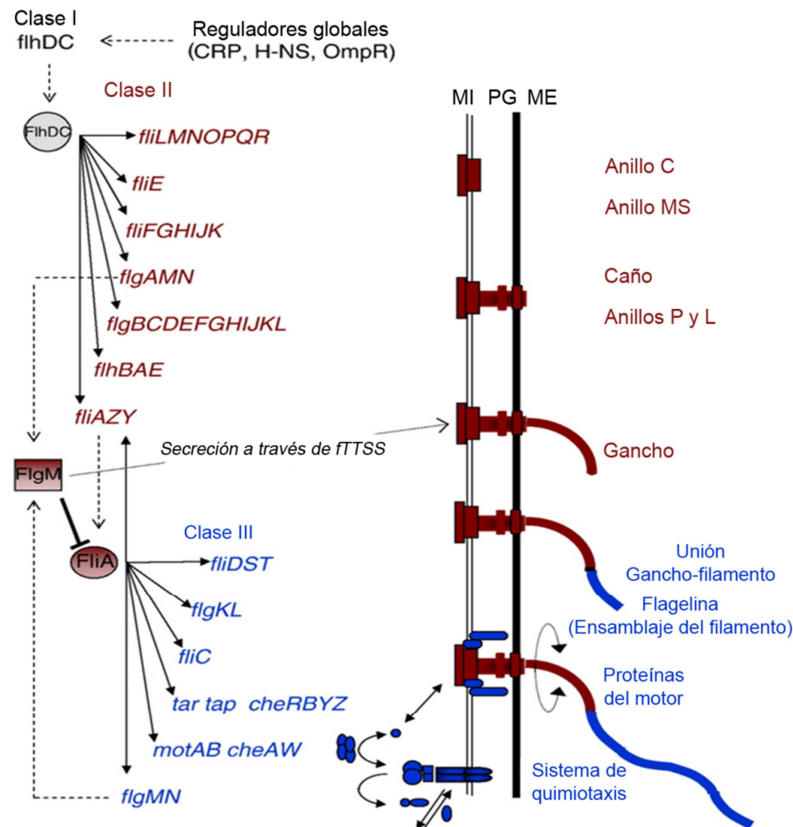
**Fig. 1.6:** Componentes principales del flagelo: cuerpo basal, gancho y filamento. **Izquierda:** Modelo simplificado del cuerpo basal- motor con sus componentes principales, pero también se incluye el gancho y el filamento. **Derecha:** El estator rodea la estructura del anillo MS. En *E. coli*, alrededor de 11 estators pueden, de manera sincronizada, estar implicados en la interacción con el rotor. ME: membrana externa. PG: peptidoglicano. MI: membrana interna o citoplasmática. Obtenido de Thormann y Paulick (2010).

### 7.1.1. Síntesis y regulación del aparato flagelar

La biogénesis del aparato flagelar supone un enorme coste energético para la bacteria. De hecho, este proceso requiere la expresión de aproximadamente 50 genes, los cuales presentan una regulación jerarquizada en varios niveles (Macnab, 2003; Thormann y Paulick; 2010). Este tipo de regulación tan fina ha sido muy bien estudiada en las Enterobacterias *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Chilcott y Hughes, 2000; Macnab, 2003), pero también se conoce bastante de lo que ocurre en especies como *Caulobacter crescentus* (England y Gober, 2001), *Sinorizobium meliloti* (Sourjik y col., 1998; Sourjik y col., 2000), *Legionella pneumophila* (Jacobi y col., 2004) y *P. aeruginosa* (Dasgupta y col., 2003), entre otras.

En el caso de *E. coli*, alrededor del 3% de su genoma, está implicado en la síntesis, autoensamblaje y funcionalidad de su flagelo (Bartlett y col., 1988). Estudios genéticos han revelado la existencia de 14 operones flagelares organizados en tres clases de genes clasificados en función de su expresión y el momento de la misma (Chilcott y Hughes, 2000) (Fig. 1.7). La cascada de regulación está controlada por el operón regulador principal formado por *flhC* y *flhD* (clase I). La expresión de este máster regulador está controlada por el sistema de represión catabólica dependiente de AMPc (adenosín monofosfato-3',5' cíclico) o CRS dependiente de AMPc (del inglés *Catabolic Repression System*) (Fig. 1.7). En respuesta a variaciones de fuentes de carbono ambientales, la adenilato ciclasa Cya, genera AMPc que es detectado por CRP (del inglés *cAMP-receptor protein*) (revisado por Botsford y Harman, 1992), y es este complejo AMPc-CRP el que regula positivamente la expresión de *flhC* y *flhD* (Soutourina y col., 1999). FlhD y FlhC se ensamblan para formar el heterohexámero FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, el cual se une a una gran cantidad de promotores y facilita así la transcripción de los genes de clase II (Liu y Matsumura, 1994). Los genes de clase II codifican proteínas que van a formar parte del cuerpo basal y del gancho, pero también sintetizan el factor sigma FliA o  $\sigma^{28}$ . Este factor es responsable de la activación de los genes de clase III, imprescindibles para que se forme todo el motor flagelar y el filamento, e implicados también en la quimiotaxis. Pero FliA se encuentra a su vez regulado post-traduccionamente por el factor anti-sigma FlgM (Chadsey y col., 1998), es decir, cuando FlgM está secuestrando a FliA, la transcripción está bloqueada, pero cuando FlgM es secretado a través del sistema de secreción tipo III del flagelo (Hughes y col., 1993; Karlinsey y col., 2000), FliA queda libre y concluye así la biogénesis y autoensamblaje flagelar (Fig. 1.7). Este tipo de regulación se puede extrapolar a más especies, algunas como *Serratia marcescens* (Stella y col., 2008) y *S. typhimurium* (Chilcott y Hughes, 2000; Macnab, 2003; Wada y col., 2011). Incluso, en otras bacterias es muy similar, ya que, por

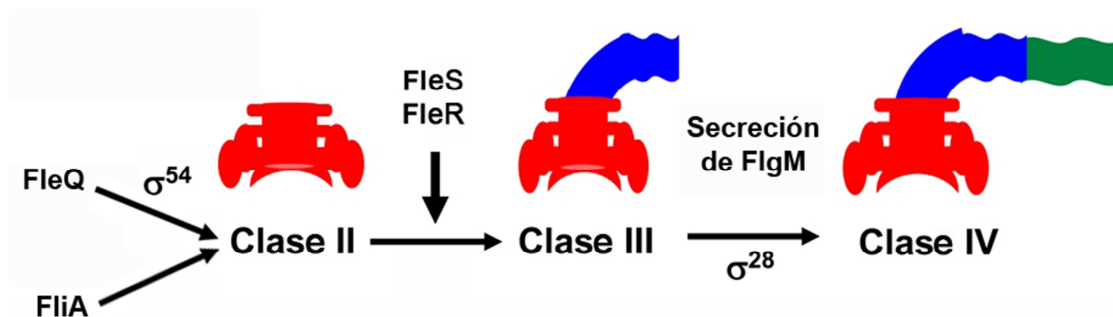
ejemplo, en *S. meliloti* existen los tres niveles de transcripción pero no se encuentran controlados por el regulador principal FlhDC, sino por VisN y VisR, que actúan como dímeros y se activan por señales aún desconocidas (Sourjik y col., 2000).



**Fig. 1.7:** Orden temporal de la expresión génica y autoensamblaje del aparato flagelar. Los operones que forman parte del sistema flagelar se expresan en orden (Kalir y col., 2001) (en la figura de arriba hacia abajo). Los productos de los genes de clase II y III están marcados en rojo y azul, respectivamente. El factor anti-sigma FlgM inhibe al factor sigma FliA (Clase III) hasta que se forma el sistema de secreción tipo III, y es exportado de la célula. FliA también regula su propia expresión y contribuye a la expresión de otros genes de clase II (Kutsukake y Lino, 1994). MI: Membrana interna, ME: membrana externa. PG: Peptidoglicano. Obtenido de Apel y Surette (2008).

Con respecto a las especies de *Pseudomonas*, existen menos similitudes en relación a este proceso, aunque sigue habiendo aspectos comunes con respecto a los descritos en Enterobacterias. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que presenta un flagelo polar necesario para la colonización y la virulencia (Arora y col., 1998; Montie y col., 1982), por lo que se ha estudiado exhaustivamente la síntesis flagelar en esta especie. Por un lado, hay que señalar que esta bacteria emplea una regulación jerárquica a cuatro niveles (Dasgupta y col., 2003) (Fig. 1.8) y por otro, que posee un regulador principal FleQ, que junto con el factor sigma RpoN o  $\sigma^{54}$ , controla directa o indirectamente la expresión de la mayoría de los genes flagelares, con excepción del factor sigma FliA (Dasgupta y col., 2003). Ambos genes, *fleQ* y *fliA* se agrupan dentro de la clase I, y su regulación no está muy clara. En los trabajos de Dasgupta

y col. (2002) se puso de manifiesto que la expresión de *fleQ* podría depender de  $\sigma^{70}$ , y sugieren que Vfr (homólogo de CRP de *E.coli*), la reprimiría. Más tarde, se localizó otro posible represor de *fleQ* implicado en la síntesis de alginato, denominado AlgU o  $\sigma^{22}$  (Tart y col., 2005), hecho confirmado en *P. fluorescens* F113, ya que mutantes en *algU* son hipermóviles y presentan mayores niveles de expresión de *fleQ* que la cepa silvestre (Martínez-Granero y col., en preparación). Por tanto, FleQ y RpoN regulan la actividad de los genes de clase II, que codifican componentes estructurales del anillo MS, del motor, del sistema de secreción tipo III, del extremo del filamento y proteínas reguladoras como FleS y FleR. Ante una señal desconocida, FleS fosforila y activa a FleR, lo que supone el comienzo de la transcripción de los genes de clase III, responsables de la síntesis de las últimas proteínas que van a formar parte del cuerpo basal y del gancho. En el trabajo de Dasgupta y col. (2003) localizan promotores en los genes de clase III con sitios de unión a RpoN, concluyendo que este factor sigma también es necesario para la expresión de este tercer *cluster*. Y el último punto de regulación de la biogénesis tiene lugar cuando el gancho y el cuerpo basal están ya constituidos. En ese momento FlgM es exportado quedando libre FliA que es el activador de los genes de clase IV (Fig. 1.8). Este último grupo de genes codifican para componentes estructurales del filamento, implicados en la rotación del motor y también en quimiotaxis.



**Fig. 1.8:** Modelo simplificado de regulación de los genes implicados en la biosíntesis del aparato flagelar de *P. aeruginosa*. El diagrama muestra los principales puntos de control en la regulación de este proceso. Los componentes del cuerpo basal, gancho y filamento aparecen en rojo, azul y verde respectivamente. FleQ junto con RpoN o  $\sigma^{54}$  controlan la expresión de la mayoría de los genes flagelares. FliA también activa a los genes de clase II. FleS fosforila y activa a FleR, y comienza la transcripción de los genes de clase III. La secreción de FlgM supone la liberación de FliA, y la culminación del proceso. Modificado de Anderson y col. (2010).

## 7.2 Biopelículas

Los microorganismos no viven de forma planctónica, como en los cultivos de laboratorio, ni tampoco se suelen disponer como células aisladas dispersas (Costerton y col., 1995). En cambio, estos organismos normalmente se acumulan en zonas de interfase donde



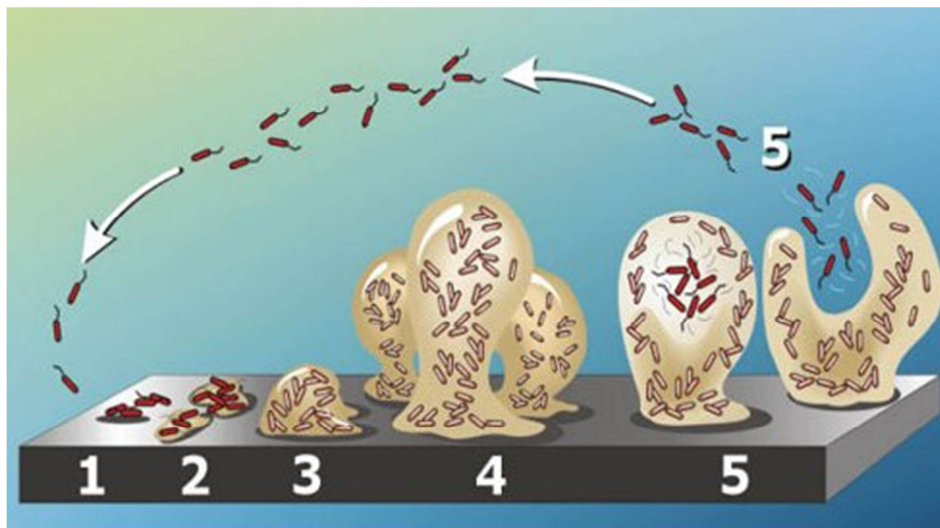
están formando agregados como tapetes, flóculos, sedimentos o biopelículas. Las biopelículas o *biofilms* microbianos, compuestos por una o múltiples especies, se definen como comunidades sésiles de bacterias, adheridas a un sustrato o a una interfase (o a ambos), que están embebidos por una matriz extracelular compuesta de exopolisacárido (EPS) de origen bacteriano (Lazăr y Chifiriuc, 2010). Estas estructuras pueden variar el fenotipo que presentan en función de factores como el crecimiento o la transcripción de genes. Las biopelículas se pueden considerar como una forma temprana de diferenciación celular, con un sistema circulatorio primitivo, una homeostasis y una integridad, bastante similar a un tejido de un organismo eucariota. Además, las bacterias que constituyen estos *biofilms* son metabólicamente más eficientes y están mejor protegidas, mostrando resistencia a diferentes estreses, como por ejemplo, los antibióticos (O'Toole y col., 2000). El hecho de que las bacterias se comporten como una comunidad supone una habilidad que es consecuencia de toda una compleja red de comunicación entre células y de las células con el medio, y es dependiente de un sistema de señalización regulado por *quorum sensing* (QS) (Davies y col., 1998). Este mecanismo que presentan todas las bacterias, está implicado en la regulación de muy distintos y complejos procesos celulares, siendo además dependiente de la densidad celular. El lenguaje utilizado para el “diálogo” entre los microorganismos se basa en pequeñas moléculas señal, denominadas autoinductores, que presentan diferentes estructuras químicas. En las bacterias Gram positivas, estos compuestos suelen ser oligopéptidos (Dunny y Leonard, 1997), mientras que en las Gram negativas son las acil-homoserina-lactonas o Acyl-HSL (Whitehead y col., 2001).

La bibliografía existente con respecto al conocimiento de la biología de las biopelículas es muy amplia, debido a que estas estructuras presentes en todo tipo de ambientes tienen una repercusión muy importante en el hombre. Los *biofilms* son mucho más tolerantes a los antibióticos que las bacterias con estilo de vida libre, siendo por tanto, una amenaza para la salud (Costerton y col., 2005; Mah y col., 2003; Manos y col., 2007; Stewart, 2002). Además, son responsables de la contaminación de los sistemas de reparto de aguas para uso doméstico y causan multitud de problemas en la industria relacionados con la contaminación biológica (Nadell y col., 2009).

### **7.2.1 Formación de biopelículas**

Muchas especies bacterianas muestran diferencias puntuales en los pasos de formación de una biopelícula, pero en general, las fases comprenden (1) una adhesión inicial reversible a la superficie a colonizar por parte de la célula natatoria, (2) seguido de un

acoplamiento irreversible (3) que dará lugar a la formación de microcolonias; (4) el desarrollo de estas pequeñas colonias encapsuladas en EPS acaban formando un *biofilm* maduro y por último, (5) una vez que la matriz está desarrollada, algunas bacterias van liberándose, lo que permite que la biopelícula se extienda cada vez más sobre la superficie y se colonicen así nuevos ambientes (Hall-Stoodley y Stoodley, 2002; Lasa, 2006; O'Toole y col., 2000) (Fig. 1.9). Cada uno de estos pasos requiere una reprogramación de la expresión genética en respuesta a los cambios ambientales (Schembri y col., 2003), y tienen lugar secuencialmente desde el momento en el que las bacterias detectan determinados parámetros del medio y sufren una transición en su estilo de vida, es decir, las células planctónicas cambian a complejas estructuras sésiles.



**Fig. 1.9:** Etapas de la formación de una biopelícula. **1:** Adhesión inicial reversible. **2:** Acoplamiento irreversible. **3.** Formación de microcolonias. **4.** Desarrollo de microcolonias y encapsulación en EPS. **5.** Matriz madura. Algunas bacterias se liberan para colonizar otras superficies cercanas. Modificado de Lasa (2006).

El inicio de la formación de una biopelícula comienza cuando las células planctónicas entran en contacto mediante uno de sus polos celulares, con una superficie abiótica o biótica, ya sea al azar o por procesos de quimiotaxis (Pratt y Kolter, 1998) (Fig. 1.9). La adhesión inicial es a menudo un proceso reversible, de tal manera que las bacterias pueden liberarse de la superficie si las condiciones cambian. En *P. aeruginosa*, una parte de los mutantes *sad* caracterizados (O'Toole y Kolter, 1998a) defectivos en la movilidad dependiente de flagelos, no eran capaces de realizar este primer paso. Además, la menor producción de la banda-B del LPS, parece ser también importante en esta adhesión temprana en *P. aeruginosa* (Makin y Beveridge, 1996) y en *P. fluorescens* (Williams y Fletcher, 1996). En otras estirpes bacterianas, como *E. coli*, el sistema flagelar es necesario tanto para el contacto inicial como para el

desplazamiento de la célula por la superficie, pero a diferencia de las *Pseudomonas*, los pili tipo IV son absolutamente esenciales en esta fase (Pratt y Kolter, 1998).

A continuación, tiene lugar un proceso de adhesión irreversible en el cual las bacterias se unen firmemente a la superficie y comienzan a dividirse, resultando en la formación de monocapas celulares (Fig. 1.9). El otro grupo de mutantes *sad* de *P. aeruginosa*, defectivos en la biogénesis de los pili tipo IV, se adhieren, forman monocapas de bacterias, pero no estructuran microcolonias, por lo que estos orgánulos parecen imprescindibles para ensamblar las células en pequeñas colonias (O'Toole y Kolter, 1998a). Por otro lado, Hinsa y col. (2003) identificaron en *P. fluorescens* WCS365 la adhesina LapA y un transportador ABC necesario para su secreción y determinaron su importancia en la transición de una adhesión reversible a irreversible, así como su papel en la interacción célula-superficie. Algunas de estas grandes proteínas de superficie o Bap (del inglés *biofilm associated proteins*) se han caracterizado también en especies patógenas de humanos como *Staphylococcus aureus* (Cucarella y col., 2001; Cucarella y col., 2004) y *Salmonella enterica* (Latasa y col., 2005). Parece ser que entre otras cosas, participan en la adhesión más tardía, mostrando por tanto, un importante papel en la colonización de tejidos animales.

En la siguiente fase, las monocapas celulares se amontonan y las bacterias siguen dividiéndose, derivando en la aparición de nuevas estructuras denominadas microcolonias donde de nuevo, juegan un papel importante proteínas de superficie (Fig. 1.9). Es imprescindible hacer referencia a un trabajo reciente en el que se determina como LapF (Espinosa-Urgel y col., 2000), la segunda adhesina más grande de *P. putida* KT2440, parece participar en el desarrollo del *biofilm*. Esta proteína se produciría en los estados tempranos de interacción con la superficie y estaría implicada en el crecimiento de la microcolonia, permitiendo la adhesión célula-célula (Martínez-Gil y col., 2010). Además, en esta fase de formación de microcolonias, los cambios en el transcriptoma van dirigidos al aumento de los niveles de expresión de genes implicados en la síntesis del EPS y a la disminución de la actividad de genes relacionados con la movilidad.

Con el tiempo, las microcolonias se desarrollan para formar la matriz madura (Fig. 1.9). Las biopelículas, aunque estén constituidas por un solo tipo de especie, son enormemente heterogéneas. Las bacterias, que en un principio son genéticamente idénticas, comienzan a divergir en varios caracteres, como la actividad metabólica, la formación de esporas, la resistencia a los antibióticos y la secreción de polímeros extracelulares (Balaban y col., 2004; Branda y col., 2001; Vasseur y col., 2005; Vlamakis y col., 2008; Xu y col., 1998). Esta última

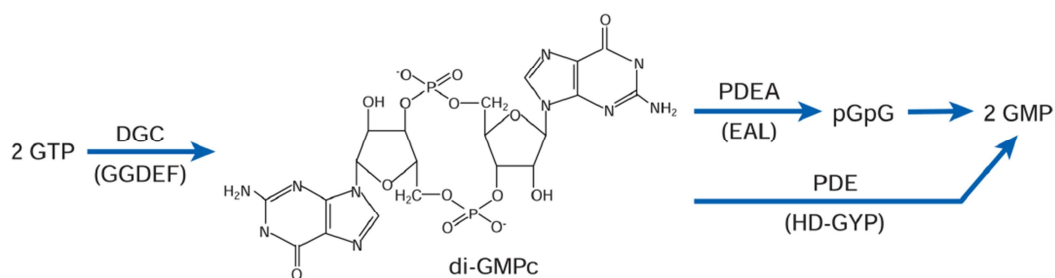
característica va a definir el tipo de *biofilm*. Las bacterias producen y son embebidas por una matriz de EPS compuesta de polisacáridos y cantidades pequeñas de proteínas y ADN (Flemming y col., 2007; Hall-Stoodley y col., 2004). Aunque no está muy claro su papel, el EPS podría tener una doble función. Por una parte, haría de andamio, de soporte estructural, y por otro, de escudo protector frente a factores externos perjudiciales, como antibióticos (Fux y col., 2005). En *Vibrio cholerae* (Hammer y Bassler, 2003), *Bacillus subtilis* (Kearns y col., 2005) y *P. aeruginosa* (Davies y col., 1993), se ha confirmado que mutantes incapaces de producir EPS presentan problemas a la hora de formar *biofilms*. Uno de los polisacáridos mejor estudiados ha sido el alginato, que únicamente es sintetizado por bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter*. Concretamente, en *P. aeruginosa*, la biosíntesis de alginato es un proceso complejo que implica una serie de proteínas cuya producción y actividad están controladas a distintos niveles. Por un lado, la expresión del operón principal donde se localizan los 12 genes estructurales (*algD-algA*) está regulada positivamente por el factor AlgT, también conocido como AlgU o  $\sigma^{22}$ , que en condiciones normales su actividad está inhibida por MucA y MucB. AlgU también controla la expresión de AlgC, que es una enzima implicada en la síntesis del precursor del alginato. Por otro lado, el sistema de dos componentes KinB/AlgB, ante una determinada señal, también regula positivamente la expresión del operón *algD-algA* (Ma y col., 1997).

En los últimos años, se ha intentado dilucidar cómo las bacterias modifican su expresión génica en el momento de formar la matriz tridimensional. Aunque no es el único mecanismo, la mayor parte de las especies utilizan el *quorum sensing* para modular la adhesión a superficies, la movilidad, la producción de EPS y la dispersión (Nadell y col., 2009). Las bacterias son capaces de disparar respuestas fisiológicas mediante la activación específica de genes cuyo control es determinado por la densidad de población. Por tanto, el QS se basa en la existencia de sistemas complejos de comunicación, que hacen saber a los distintos miembros de la población cuál es su densidad y en función de eso transcribir genes en momentos concretos (Bassler y Losik, 2006; Hense y col., 2007). Muchas especies regulan la formación de biopelículas mediante procesos de detección de alta densidad celular, de hecho, cepas mutantes en la detección de autoinductores, son incapaces de desarrollar matrices maduras (Parsek y Greenberg, 2005).

### 7.3 di-GMPc

Los segundos mensajeros citoplasmáticos transmiten las señales recibidas en la superficie celular por los primeros mensajeros a moléculas diana que se encuentran localizadas en el interior de la célula. A menudo, este proceso permite la amplificación de la señal original en señales intracelulares capaces de producir cambios bioquímicos muy importantes. Nucleótidos como el adenosín monofosfato-3',5' cíclico (AMPc) o el bis- (3', 5')-monofosfato de guanosina cíclico (di-GMPc) presentan esta capacidad y son las moléculas señal intracelulares mejor caracterizadas desde hace más de 20 años. Concretamente, el di-GMPc fue por primera vez descrito en *Gluconacetobacter xylinus*, definiéndose como un activador alostérico de la celulosa sintasa (Ross y col., 1987), pero es en la actualidad cuando está cobrando una gran importancia.

El di-GMPc funciona como un segundo mensajero en bacterias y está implicado en fenómenos como la resistencia a antibióticos, la virulencia, la movilidad y la formación de biopelículas. Esta molécula soluble está constituida por dos residuos de riboguanosina unidos por enlaces 3'-5' fosfodiéster, configurándose así una estructura cíclica (Fig. 1.10). Por medio de análisis de espectrometría de masas, se determinó que cuatro moléculas de este dinucleótido cíclico se alineaban para formar dos cuartetos de guanina paralelos, generándose una cavidad central, donde se produce la unión con los diferentes iones presentes en el medio (Egli y col. 1990; Liaw y col., 1990). La síntesis y degradación del di-GMPc está catalizada por enzimas con actividad diguanilato ciclasa (DGC) y fosfodiesterasa (PDE), respectivamente. Existen tres dominios proteicos implicados en el metabolismo del di-GMPc, y se han nombrado en función de la secuencia de aminoácidos más conservada de sus sitios activos: GGDEF, EAL y HD-GYP. Los dominios GGDEF presentan actividad DGC, generando di-GMPc a partir de dos moléculas de GTP, mientras que los dominios EAL y HD-GYP tienen actividad PDE, e hidrolizan este di-GMPc en 5'- fosfoguanilil- (3'-5')- guanosina (pGpG), que inmediatamente se degrada para formar 2 GMP (Christen y col., 2005; Paul y col., 2004; Tamayo y col., 2007). Así, estas actividades juntas, mantienen en un estado fijo las concentraciones de di-GMPc en la célula (Fig. 1.10).



**Fig. 1.10:** Ruta de regulación del di-GMPc. Este segundo mensajero es sintetizado en los dominios GGDEF presentes en las enzimas con actividad DGC a partir de 2 moléculas de GTP. El di-GMPc se hidroliza por los dominios EAL presentes en enzimas con actividad PDE en la molécula lineal pGpG, que posteriormente se hidroliza por otras PDEs en dos moléculas de GMP. Los dominios HD-GYP hidrolizan el di-GMPc directamente en 2 moléculas de GMP. Modificado de Tamayo y col. (2007).

Todos estos dominios se encuentran enormemente conservados en el mundo procariota (Tatusov y col., 2001). Se han encontrado homólogos de estas proteínas sólo en Eubacteria, lo que implica que la señalización por di-GMPc es específica en este dominio. El número de proteínas que portan GGDEF, EAL o HD-GYP en los genomas bacterianos es bastante variable. Existen pocas especies donde no se han encontrado, como *Helicobacter pilory*, otras que presentan un número intermedio, como *P. aeruginosa* o *E.coli*, que poseen 38 y 29, respectivamente (Kulasakara y col., 2006; Weber y col., 2006), y por último, especies donde se han encontrado más de 50, como *Vibrio cholerae* (Lim y col., 2006).

El dominio GGDEF se caracterizó por primera vez en la proteína PleD de *Caulobacter crescentus* como un regulador de respuesta involucrado en la transición de células libres flageladas a células no móviles capaces de adherirse a superficies (Aldridge y Jenal, 1999). Tras estudios de búsquedas de proteínas homólogas portadoras de esta secuencia, se determinó su relación estructural con la familia de las adenilato ciclasas (Pei y Grishin, 2001). Estos dominios presentan dos sitios, el sitio A y el sitio I. El primero es el centro activo donde se cataliza el di-GMPc y se localiza el motivo GG[DE][DE]F. Cualquier mutación en esta secuencia suprime la actividad enzimática (Ryjenkov y col., 2005). El sitio I tiene un motivo llamado RxxD y presenta un núcleo alostérico de unión a di-GMPc que es responsable de la inhibición por producto no competitiva (Christen y col., 2006). Con posterioridad al descubrimiento del dominio GGDEF, se definió el dominio EAL (ácido glutámico-alanina-leucina), localizándose adyacentemente al primero y describiéndose inicialmente como un factor transcripcional regulador de los genes de virulencia de *Bordetella pertusis* (Merkel y col., 1998). Para su actividad, los dominios EAL necesitan  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ , mientras que se inhiben por  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  y aún no se conoce el sitio activo de este dominio (Tamayo y col., 2007). Muy recientemente y mediante estudios

bioinformáticos, se sugirió la existencia de un tercer dominio implicado en la hidrólisis del di-GMPc, denominado HD-GYP (Galperin y col., 1999; Galperin y col., 2001). Los HD-GYP son un subgrupo dentro de la superfamilia de las HD (fosfohidrolasas dependientes de metales). Los análisis que se realizaron cuando se descubrieron, mostraron que en los genomas de muchas bacterias se encontraban asociados a dominios Che-Y, indicando un papel en señalización (Galperin y col., 1999; Galperin, 2001; Galperin y col., 2001).

También se ha estudiado la distribución de estos dominios en los genomas bacterianos. En primer lugar, existen proteínas multidominio que presentan únicamente GGDEF o EAL/ HD-GYP y que tienen en su extremo N-terminal un dominio sensor. Estas regiones son las que van a detectar señales ambientales como por ejemplo, la luz o el O<sub>2</sub> (dominios PAS); o señales intracelulares del tipo fosforilación o unión de nucleótidos (dominios REC/ Che-Y y GAF respectivamente) que serán transmitidas a dominios efectores presentes en el extremo C-terminal. En segundo lugar, se han localizado proteínas que tienen los dos dominios, un GGDEF seguido de otro EAL o HD-GYP. Normalmente, estas proteínas no suelen presentar ambas actividades y en muchos casos no se puede predecir cuál de las dos es la dominante. A menudo, ocurre algo similar a lo documentado para *C. crescentus*, es decir, uno de los dominios es funcional y el otro tiene actividad reguladora. En esta bacteria se localizó la proteína CC3396 que presenta un dominio GGDEF y uno EAL, pero únicamente existe actividad PDE *in vitro*. Esto es debido a que el centro activo del dominio GGDEF está alterado, lo que no impide que pueda unir GTP y regular el dominio EAL (Christen y col., 2005).

### **7.3.1 El di-GMPc y los fenotipos en la célula bacteriana**

Los niveles celulares de este segundo mensajero son los responsables de regular distintos fenotipos bacterianos, pero en general, altas concentraciones de di-GMPc hacen que el estado de vida bacteriano derive hacia la formación de biopelículas. Se disparan rutas de señalización que culminan en la puesta en marcha de la expresión de genes responsables de sintetizar estructuras o componentes celulares relacionados con la adhesión, como fimbrias, exopolisacáridos o celulosa. Así mismo, bajos niveles de di-GMPc implican un aumento en la movilidad de la bacteria, es decir, favorecen un estado de vida planctónico (Boles y McCarter, 2002; Drenkard y Ausubel, 2002; García y col., 2004; Güvener y McCarter, 2003; Ko y Park, 2000; Levi y Jenal, 2006; Simm y col., 2005; Tischler y Camilli, 2004). Por tanto, la transición entre un estado de vida sésil y un estado de vida libre está controlada por los niveles de este segundo mensajero.

La primera vez que se relacionó el di-GMPc con la disminución de la movilidad dependiente de flagelos fue en *S. Typhimurium* (Simm y col., 2004). En esta cepa, la expresión ectópica de la proteína AdrA (con actividad DGC) suponía una inhibición importante de la movilidad *swimming* y *swarming*, mientras que la sobreexpresión de YhjH (con actividad PDE) aumentaba estos tipos de locomoción. Estos autores obtuvieron los mismos resultados en otras cepas, como *P. aeruginosa* y *E. coli*. También se ha descrito que la sobreexpresión de VieA (con actividad PDE), aumenta la movilidad tipo *swimming* en *Vibrio cholerae* (Beyhan y col., 2006); no obstante, un mutante en esta proteína conlleva un incremento de los niveles de di-GMPc, una disminución del movimiento y un gran aumento de la formación de *biofilms* (Martinez-Wilson y col., 2008). Estudios muy recientes del grupo de O'Toole con la cepa *P. aeruginosa*, han estado dirigidos a demostrar la regulación inversa entre la movilidad tipo *swarming* y la formación de biopelículas. En primer lugar describieron como la proteína BifA (del inglés *biofilm formation*) reduce a la mitad los niveles celulares de di-GMPc en condiciones normales. Esta es una proteína transmembrana que presenta en su estructura un dominio GGDEF y uno EAL, pero únicamente tiene actividad PDE. La alteración de *bifA* deriva en una cepa incapaz de hacer *swarming* y que además incrementa la síntesis de polisacáridos a través de los genes *pel* (Kuchma y col., 2007). Sin embargo, mutaciones en la diguanilato ciclasa transmembrana SadC, genera células que hacen un 30% más de *swarming* que la cepa silvestre, y por tanto, muy afectadas en la formación de biopelículas (Merrit y col., 2007). En *P. aeruginosa* también se ha relacionado la movilidad tipo *twitching* y *swimming* con el segundo mensajero di-GMPc y con el sistema quimiosensor Wsp, cuyo modelo de regulación es similar al sistema Che de Enterobacterias (Bantinaki y col., 2007). WspR y WspF son proteínas reguladoras de respuesta que presentan actividad DGC y metilesterasa, respectivamente. Bajos niveles de WspR no desencadenan ningún fenotipo, mientras que la alteración de *wspF* resulta en el aumento de la capacidad de formar *biofilms* y en la reducción de *twitching* y *swimming* (D'Argenio y col., 2002; Hickman y col., 2005). Las señales extracelulares que activan el sistema Wsp no se conocen aún, pero la actividad DGC de WspR promueve en la bacteria un estado de vida sésil, presumiblemente por un incremento en la expresión del operón *pel* que contribuye a la formación de EPS (Jackson y col., 2004). Un reciente trabajo de Pesavento y col. (2008) retoma el tema de regulación inversa de la movilidad y la adhesión en *E. coli*. Los niveles de di-GMPc en esta cepa dependen de YegE (con actividad DGC) y de YhjH (con actividad PDE), que a su vez se encuentran controladas por  $\sigma^S$  y FlhDC, respectivamente. Ante una determinada señal, FlhDC activa indirectamente a YhjH, disminuyendo la concentración del segundo mensajero. Aumenta así la actividad flagelar y no hay transcripción de *csgD*, el cual codifica un activador de la expresión de fimbrias. Por último, en *P. fluorescens*



F113 se han descrito represores de la movilidad que parece que también están relacionados con la síntesis y degradación del di-GMPc. Mutantes en los genes *sadB* y *wspR*, descritos previamente como implicados en el metabolismo del di-GMPc, se caracterizan por ser hipermóviles tanto en *swimming* como en *swarming*, con respecto a la cepa parental (Navazo y col., 2009). Así mismo, dichos mutantes están enormemente afectados en la formación de biopelículas (Barahona y col., 2010).

## BIBLIOGRAFÍA

- Achouak W., Conrod S., Cohen V., y Heulin T. (2004). Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root-colonization strategy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**: 872-879.
- Aguirre de Cárcer D., Martín M., Karlson U., y Rivilla R. (2007a). Changes in bacterial populations and in biphenyl dioxygenase gene diversity in a PCB polluted soil after introducing willow trees for rhizoremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6224-6232.
- Aguirre de Cárcer D., Martín M., Karlson U., y Rivilla R. (2007b). The introduction of genetically modified microorganisms designed for rhizoremediation induces changes on native bacteria in the rhizosphere but not in the surrounding soil. *The ISME Journal.* **1**: 215-223.
- Aldridge P., y Jenal U. (1999). Cell cycle-dependent degradation of a flagellar motor component requires a novel-type response regulator. *Mol. Microbiol.* **32**: 379-391.
- Aldridge P., y Hughes K.T. (2002). Regulation of flagellar assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 160-165.
- Amann R.I., Ludwig W., y Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Anderson T.A., Guthrie E.A., y Walton B.T. (1993). Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* **27**: 2630-2636.
- Anderson J.K., Smith T.G., y Hoover T.R. (2010). Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. *Trends Microbiol.* **18**: 30-37.
- Apel D., y Surette M.G. (2008). Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**: 1851-1858.
- Arora S.K., Ritchings B.W., Almira E.C., Lory S., y Ramphal R. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect. Immun.* **66**: 1000-1007.
- Audenaert K., Pattery T., Cornelis P., y Höfte M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 1147-1156.
- Babalola O.O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* **32**: 1559-1570.
- Badri D.V., y Vivanco J.M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.* **32**: 666-681.
- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., y Vivanco J.M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **57**: 233-266.
- Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J., y van Loon L.C. (2007). Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology.* **97**: 239-243.
- Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., y Leibler S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science.* **305**: 1622-1625.
- Bantinaki E., Kassen R., Knight C.G., Robinson Z., Spiers A.J., y Rainey P.B. (2007). Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. III. Mutational origins of wrinkly spreader diversity. *Genetics.* **176**: 441-453.

- Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J.V., Vangronsveld J., y van der Lelie D.** (2004). Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat. Biotechnol.* **22**: 583-588.
- Barahona E., Navazo A., Yousef-Coronado F., Aguirre de Cárcer D., Martínez-Granero F., Espinosa-Urgel M., Martín M., y Rivilla R.** (2010). Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113 mutants unable to form biofilms in abiotic surfaces. *Environ. Microbiol.* **12**: 3185-3195.
- Barahona E., Navazo A., Martínez-Granero F., Zea-Bonilla T., Pérez-Jiménez R.M., Martín M., y Rivilla R.** (2011). A *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability shows improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* In press.
- Bar-Ness E., Chen Y., Hadar H., Marschner H., y Romheld V.** (1991). Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants. *Plant Soil.* **130**: 231-241.
- Barea J.M., Pozo M.J., Azcón R., y Azcón-Aguilar C.** (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **56**: 1761-1778.
- Barns S.M., Takala S.L., y Kuske C.R.** (1999). Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1731-1737.
- Barr M., East A.K., Leonard M., Mauchline T.H., y Poole P.S.** (2008). In vivo expression technology (IVET) selection of genes of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae A34 expressed in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Lett.* **282**: 219-227.
- Bartlett D.H., Frantz B.B., y Matsumura P.** (1988). Flagellar transcriptional activators FlbB and Flal: gene sequences and 5' consensus sequences of operons under FlbB and Flal control. *J. Bacteriol.* **170**: 1575-1581.
- Bassler B.L., y Losick R.** (2006). Bacterially speaking. *Cell.* **125**: 237-246.
- Bender C.L., Rangaswamy V., y Loper J.E.** (1999). Polyketide production by plant-associated pseudomonads. *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**: 175-196.
- Berg G., Roskot N., Steidle A., Eberl L., Zock A., y Smalla K.** (2002). Plant dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3328-3338.
- Berg G.** (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**: 11-18.
- Bevivino A., Sarrocco S., Dalmastri C., Tabacchioni S., Cantale C., y Chiarini L.** (1998). Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**: 225-237.
- Beyhan S., Tischler A.D., Camilli A., y Yildiz F.H.** (2006). Differences in gene expression between the classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* O1. *Infect. Immun.* **74**: 3633-3642.
- Bloemberg G.V., O'Toole G.A., Lugtenberg B.J.J., y Kolter R.** (1997). Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4543-4551.
- Boch J., Joardar V., Gao L., Robertson T.L., Lim M., y Kunkel B.N.** (2002). Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* genes induced during infection of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Microbiol.* **44**: 73-88.

- Boles B.R., y McCarter L.L.** (2002). *Vibrio parahaemolyticus* *scrABC*, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation. *J. Bacteriol.* **184**: 5946-5954.
- Botsford J.L., y Harman J.G.** (1992). Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **56**: 100-122.
- Bowen G.D., y Rovira A.D.** (1976). Microbial colonization of plant roots. *Annual Review of Phytopathology.* **14**: 121-144.
- Bowen G.D., y Rovira A.D.** (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy.* **66**: 1-102.
- Branda S.S., González-Pastor J.E., Ben-Yehuda S., Losick R., y Kolter R.** (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 11621-11626.
- Brazil G.M., Kenefick L., Callanan M., Haro A., de Lorenza V., Dowling D.N., y O'Gara F.** (1995). Construction of a rhizosphere pseudomonad with potencial to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bph* gene expression in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1946-1952.
- Buée M., Rossignol M., Jauneau A., Ranjeva R., y Bécard G.** (2000). The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 693-698.
- Bull C.T., Weller D.M., y Thomashow L.S.** (1991). Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology.* **81**: 954-959.
- Buysen S., Heungens K., Poppe J., y Hofte M.** (1996). Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 865-871.
- Capdevila S., Martínez-Granero F.M., Sánchez-Contreras M., Rivilla R., y Martín M.** (2004). Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiol.* **150**: 3889-3897.
- Caplan J.A.** (1993). The worldwide bioremediation industry: prospects for profit. *Trends Biotechnol.* **11**: 320-323.
- Cattelan A.J., Hartel P.G., y Fuhrmann J.J.** (1999). Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**: 1670-1680.
- Chadsey M.S., Karlinsey J.E., y Hughes K.T.** (1998). The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium*  $\sigma^{28}$  RNA polymerase holoenzyme. *Genes Dev.* **12**: 3123-3136.
- Chapon A., Guillermin A.Y., Delalande L., Lebreton L., y Sarniguet A.** (2002). Dominant colonisation of wheat roots by *Pseudomonas fluorescens* Pf29A and selection of the indigenous microflora in the presence of the take-all fungus. *European Journal of Plant Pathology.* **108**: 449-459.
- Chaussod R.** (1996). La qualité biologique des sols: évaluation et implications. *Etude et Gestion de Sols.* **3**: 261-278.
- Chilcott G.S., y Hughes K.T.** (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 694-708.

- Chin-A-Woeng T.F.C., De Priester W., Van Der Bij A.J., y Lugtenberg B.J.J.** (1997). Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 79-86.
- Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., van der Bij A.J., van der Drift K.M.G.M., Schripsema J., Kroon B., Scheffer R.J., Keel C., Bakker P.A.H.M., De Bruijn F.J., Thomas-Oates J.E., y Lugtenberg B.J.J.** (1998). Biocontrol by phenazine-1-carboxamide producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 79-86.
- Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Mulders I.H., Dekkers L.C., y Lugtenberg B.J.** (2000). Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1340-1345.
- Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., y Lugtenberg B.J.** (2003). Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytol.* **157**: 503-523.
- Christen M., Christen B., Folcher M., Schauerte A., y Jenal U.** (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J. Biol. Chem.* **280**: 30829-30837.
- Christen B., Christen M., Paul R., Schmid F., Folcher M., Jenoe P., Meuwly M., y Jenal U.** (2006). Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J. Biol. Chem.* **281**: 32015-32024.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., y Barka E.A.** (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4951-4959.
- Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C., y López-Bucio J.** (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **149**: 1579-1592.
- Cook R.J., Thomashow L.S., Weller D.M., Fujimoto D., Mazzola M., Banger G., y Kim D.** (1995). Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* **92**: 4197-4201.
- Cooke R.** (1977). *The Biology of Symbiotic Fungi*. (eds Wiley J. & Sons). London. pp. 282.
- Cordier C., Gianinazzi S., y Gianinazzi-pearson V.** (1996). Colonization patterns of root tissues by *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant Soil.* **185**: 223-232.
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., y Lappin-Scott H.M.** (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711-745.
- Costerton J.W., Montanaro L., y Arciola C.R.** (2005). Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int. J. Artif. Organs.* **28**: 1062-1068.
- Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J., y Moënné-Loccoz Y.** (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**: 505-512.

- Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I., y Penadés J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **183**: 2888-2896.
- Cucarella C., Tormo M.A., Ubeda C., Trottonda M.P., Monzón M., Peris C., Amorena B., Lasa I., y Penadés J.R. (2004). Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **72**: 2177-2185.
- Cunningham S.D., y Ow D.W. (1996). Promises and Prospects of Phytoremediation. *Plant Physiol.* **110**: 715-719.
- D'Argenio D.A., Calfee M.W., Rainey P.B., y Pesci E.C. (2002). Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J. Bacteriol.* **184**: 6481-6489.
- Dakora F.D., y Phillips D.A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil.* **245**: 35-47.
- Dandurand L.M., Schotzko D.J., y Knudsen G.R. (1997). Spatial patterns of rhizoplane populations of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3211-3217.
- Daniel R. (2005). The metagenomics of soil. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 470-478.
- Dardanelli M.S., Manyani H., y González-Barroso S. (2009). Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. *Plant Soil.* **319**: 83-93.
- Dasgupta N., Ferrell E.P., Kanack K.J., West S.E.H., y Ramphal R. (2002). *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is  $\sigma 70$  dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* **184**: 5240-5250.
- Dasgupta N., Wolfgang M.C., Goodman A.L., Arora S.K., Jyot J., Lory S., y Ramphal R. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **50**: 809-824.
- Davies D.G., Chakrabarty A.M., y Geesey G.G. (1993). Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1181-1186.
- Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Igleski B.H., Costerton J.W., y Greenberg E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* **280**: 295-298.
- DeFlaun M.F., Tanzer A.S., McAteer A.L., Marshall B., y Levy S.B. (1990). Development of an Adhesion Assay and Characterization of an Adhesion-Deficient Mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 112-119.
- DeFlaun M.F., Marshall B.M., Kulle E.P., y Levy S.B. (1994). Tn5 Insertion Mutants of *Pseudomonas fluorescens* Defective in Adhesion to Soil and Seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2637-2642.
- Dekkers L.C., Bloemendaal C.J., de Weger L.A., Wijffelman C.A., Spaik H.P., y Lugtenberg B.J. (1998a). A two-component system plays an important role in the root-colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 45-56.

- Dekkers L.C., Phoelich C.C., van der Fits L., y Lugtenberg B.J.** (1998b). A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 7051-7056.
- Dekkers L.C., van der Bij A.J., Mulders I.H.M., Phoelich C.C., Wentwoord R.A.R., Glandorf D.C.M., Wijffelman C.A., y Lugtenberg B.J.** (1998c). Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and NADH: ubiquinone oxidoreductase (nuo) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 763-771.
- Dekkers L.C., Mulders I.H., Phoelich C.C., Chin-A-Woeng T.F., Wijfjes A.H., y Lugtenberg B.J.J.** (2000). The *sss* colonization gene of the tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1177-1183.
- de Weert S., Vermeiren H., Mulders I.H.M., Kuiper I., Hendrickx N., Bloemberg G.V., Vanderleyden J., de Mot R., y Lugtenberg B.J.J.** (2002). Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 1173-1180.
- de Weger L.A., van der Vlugt C.I.M., Wijfjes A.H.M., Bakker P.A.H.M., Schippers B., y Lugtenberg B.J.J.** (1987). Flagella of a plant growth stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.* **169**: 2769-2773.
- de Weger L.A., van Loosdrecht M.C., Klaassen H.E., y Lugtenberg B.** (1989). Mutational changes in physiochemical cell surface properties of plant-growth-stimulating *Pseudomonas* spp. do not influence the attachment properties of the cells. *J. Bacteriol.* **171**: 2756-2761.
- Djonovic S., Pozo M.J., Dangott L.J., Howell C.R., y Kenerley C.M.** (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 838-853.
- Doran J.W., y Jones A.** (1996). Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. In: *Methods for assessing soil quality* (eds Doran J.W., y Jones A.). SSSA special publication. Madison, WI: ASA. **49**: 25-37.
- Doran J.W., y Zeiss M.R.** (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology.* **15**: 3-11.
- Dörr J., Hurek T., y Reinhold-Hurek B.** (1998). Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Mol. Microbiol.* **30**: 7-17.
- Drenkard E., y Ausubel F.M.** (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature.* **416**: 740-743.
- Dua M., Singh A., Sethunathan N., y Johri A.K.** (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 143-152.
- Duffy B.K., y Défago G.** (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 2429-2438.
- Dunny G.M., y Leonard B.A.** (1997). Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**: 527-564.

- Dybvig K.** (1993). DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **10**: 465-471.
- Egli M., Gessner R.V., Williams L.D., Quigley G.J., van der Marel G.A., van Boom J.H., Rich A., y Frederick C.A.** (1990). Atomic-resolution structure of the cellulose synthase regulator cyclic diguanylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 3235-3239.
- England J.C., y Gober J.W.** (2001). Cell cycle control of cell morphogenesis in *Caulobacter*. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 674-680.
- Espinosa-Urgel M., Salido A., y Ramos J.L.** (2000). Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J. Bacteriol.* **182**: 2363-2369.
- Fenton A.M., Stephens P.M., Crowley J., O'Callaghan M., y O'Gara F.** (1992). Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinos biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3873-3878.
- Ferris H.U., y Minamino T.** (2006). Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly. *Trends Microbiol.* **14**: 519-526.
- Flemming H.C., Neu T.R., y Wozniak D.J.** (2007). The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J. Bacteriol.* **189**: 7945-7947.
- Foster R.C.** (1988). Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fertil. Soils.* **6**: 189-203.
- Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P.** (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* **13**: 34-40.
- Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., y Ryals J.** (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science.* **261**: 754-756.
- Gal M., Preston G.M., Massey R.C., Spiers A.J., y Rainey P.B.** (2003). Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces. *Mol. Ecol.* **12**: 3109-3121.
- Galperin M.Y., Natale D.A., Aravind L., y Koonin E.V.** (1999). A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 303-305.
- Galperin M.Y.** (2001). Conserved 'hypothetical' proteins: new hints and new puzzles. *Comp. Funct. Genomics.* **2**: 14-18.
- Galperin M.Y., Nikolskaya A.N., y Koonin E.V.** (2001). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**: 11-21.
- Gamalerio E., Lingua G., Tombolini R., Avidano L., Pivato B., y Berta G.** (2005). Colonization of tomato root seedling by *Pseudomonas fluorescens* 92rkG5: spatio-temporal dynamics, localization, organization, viability, and culturability. *Microb. Ecol.* **50**: 289-297.
- Gamliel A., y Katan J.** (1992). Chemotaxis of fluorescent pseudomonads towards seed exudates and germinating seeds in solarized soil. *Phytopathology.* **82**: 328-332.
- García B., Latasa C., Solano C., Portillo F.G., Gamazo C., y Lasa I.** (2004). Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **54**: 264-277.



- Gaworzewska E.T., y Carlile M.J.** (1982). Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. *Journal of General Microbiology*. **128**: 1179-1188.
- Gerhardt K.E., Huang X.D., Glick B.R., y Greenberg B.M.** (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci*. **176**: 20-30.
- Giri B., Giang P.H., Kumari R., Prasad R., y Varma A.** (2005). Microbial diversity in soils. In: *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions* (eds Buscot F., y Varma S.) Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. pp. 195-212.
- Girvan M.S., Bullimore J., Pretty J.N., Osborn A.M., y Ball A.S.** (2003). Soil type is the primary determinant of the composition of total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1800-1809.
- Glick B.R.** (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 109-117.
- Gómez-Gómez L., y Boller T.** (2000). FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cel.* **5**: 1003-1011.
- Grosser R.J., Warshawsky D., y Vestal J.R.** (1991). Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo(a)pyrene, and carbazole in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3462-3469.
- Gunnell D., Eddleston M., Phillips M.R., y Konradsen F.** (2007). The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Public Health*. **7**: 357.
- Güvener Z.T., y McCarter L.L.** (2003). Multiple regulators control capsular polysaccharide production in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **185**: 5431-5441.
- Haas D., y Défago G.** (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 307-319.
- Hall-Stoodley L., y Stoodley P.** (2002). Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 228-233.
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., y Stoodley P.** (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 95-108.
- Hammer B.K., y Bassler B.L.** (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **50**: 101-104.
- Hansen M., Kragelund L., Nybroe O., y Sorensen J.** (1997). Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 353-360.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., y Lorito M.** (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 43-56.
- Harman G.E.** (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. **96**: 190-194.
- Harris R.F., Karlen D.L., y Mulla D.J.** (1996). A conceptual framework for assessment and management of soil quality and health. In: *Methods for Assessing Soil Quality*. (eds Doran J.W., y Jones A. J.) SSSA special publication, Madison, WI: ASA. **49**: 61-82.

- Harshey R.M.** (1994). Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **13**: 389-394.
- Hartley J.L.** (1965). Mycorrhiza. In: *Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens*. Berkeley, University of California Press. pp. 218-229.
- Hassink J., Whitmore A.P., y Kubat J.** (1997). Size and density fractionation of soil organic matter and the physical capacity of soils to protect organic matter. *European Journal of Agronomy*. **7**: 189-199.
- Heeb S., y Haas D.** (2001). Regulatory roles of the GacS-GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 1351-1363.
- Heitzer A., y Sayler G.S.** (1993). Monitoring the efficacy of bioremediation. *Trends Biotechnol.* **11**: 334-343.
- Hense B.A., Kuttler C., Müller J., Rothballer M., Hartmann A., y Kreft J.U.** (2007). Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 230-239.
- Hickman J.W., Tifrea D.F., y Harwood C.S.** (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**: 14422-14427.
- Hiltner L.** (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und der Brache. *Arb. DLG*. **98**: 59–78.
- Hinsa S.M., Espinosa-Urgel M., Ramos J.L., y O'Toole G.A.** (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol. Microbiol.* **49**: 905-918.
- Höfte M., Dong Q., Kourambas S., Krishnapillai V., Sherratt D., y Mergeay M.** (1994). The *sss* gene product, which affects pyoverdine production in *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2, is a site-specific recombinase. *Mol. Microbiol.* **14**: 1011-1020.
- Howie W.J., Cook R.J., y Weller D.M.** (1987). Effects of soil matrix potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathology*. **77**: 286-292.
- Hughes K.T., Gillen K.L., Semon M.J., y Karlinsey J.E.** (1993). Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science*. **262**: 1277-1280.
- Iavicoli A., Boutet E., Buchala A., y Métraux J.P.** (2003). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 851-858.
- Jackson K.D., Starkey M., Kremer S., Parsek M.R., y Wozniak D.J.** (2004). Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *J. Bacteriol.* **186**: 4466-4475.
- Jacobi S., Schade R., y Heuner K.** (2004). Characterization of the alternative sigma factor sigma54 and the transcriptional regulator FleQ of *Legionella pneumophila*, which are both involved in the regulation cascade of flagellar gene expression. *J. Bacteriol.* **186**: 2540-2547.
- Jacobsen C.S.** (1997). Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DBO1(pRO101) in 2,4-D contaminated soil. *Plant Soil*. **189**: 139-144.

- Jeffries P., y Dodd J.C.** (1996). Functional ecology of mycorrhizal fungi in sustainable soil-plant systems. In: *Mycorrhizas in Integrated Systems from Genes to Plant Development*. (eds Azcon-Aguilar C., y Barea J.M.) European Commission Report, Brussels. pp. 497-501.
- Johansson J.F., Paul L.R., y Finlay R.D.** (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 1-13.
- Kalir S., McClure J., Pabbaraju K., Southward C., Ronen M., Leibler S., Surette M.G., y Alon U.** (2001). Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science*. **292**: 2080-2083.
- Kamilova F., Validov S., Azarova T., Mulders I., y Lugtenberg B.** (2005). Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* **7**: 1809-1817.
- Kamilova F., Kravchenko L.V., Shaposhnikov A.I., Azarova T., Makarova N., y Lugtenberg B.** (2006). Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 250-256.
- Kang Y.W., Carlson R., Tharpe W., y Schell M.A.** (1998). Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3939-3947.
- Kang Y., Liu H., Genin S., Schell M.A., y Denny T.P.** (2002). *Ralstonia solanacearum* requires type IV pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol. Microbiol.* **2**: 427-437.
- Karlinsey J.E., Tanaka S., Bettenworth V., Yamaguchi S., Boos W., Aizawa S.I., y Hughes K.T.** (2000). Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription. *Mol. Microbiol.* **37**: 1220-1231.
- Karlson U., Dowling D., O’Gara F., Rivilla R., Bittens M., Francesconi S., Pritchard H., y Pedersen H.C.** (1998). Development of self-contained plant/GMM systems for soil bioremediation. In: Past, Present and Future Risk Assessment when using GMOs (eds de Vries G.E.) Overschild, NL: ProBio Partners. pp. 23-31.
- Kearns D.B., Chu F., Branda S.S., Kolter R., y Losick R.** (2005). A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **55**: 739-749.
- Keel C., Wirthner P., Oberhätsli T., Voisard C., Burger U., Haas D., y Défago G.** (1990). Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis*. **9**: 327-341.
- Keel C., Schnider U., Maurhofer M., Voisard C., Laville J., Burger U., Wirthner P., Haas D., y Défago G.** (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 4-13.
- Keel C., Weller D.M., Natsch A., Défago G., Cook R.J., y Thomashow L.S.** (1996). Conservation of the 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 552-556.

- Kibblewhite M.G., Ritz K., y Swift M.J.** (2008). Soil health in agricultural systems. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **363**: 685-701.
- Kim K.Y., Jordan D., y McDonald G.A.** (1998). Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soils.* **26**: 79-87.
- Kingsley M.T., Fredrickson J.K., Metting F.B., y Seidler R.J.** (1994). Environmental restoration using plant-microbe bioaugmentation. In: *Bioremediation of Chlorinated and Polyaromatic Hydrocarbon Compounds* (eds Hinchee R.E., Leeson A., Semprini L., y Ong S.K.) Lewis publishers, Boca Raton. Florida, USA. pp. 287-292.
- Kloepper J.W.** (1994). Plant growth-promoting rhizobacteria. In: *Azospirillum/Plant Associations*. (eds Okon Y.) CRC Press, Boca Raton. Florida, USA. pp. 137-166.
- Ko M., y Park C.** (2000). Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **303**: 371-382.
- Kragelund L., y Nybroe O.** (1996). Competition between *Pseudomonas fluorescens* Ag1 and *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4) during colonization of barley roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**: 41-51.
- Kraus J., y Loper J.E.** (1992). Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of Pythium Damping-Off of cucumber. *Phytopathology.* **82**: 264-271.
- Kuchma S.L., Brothers K.M., Merritt J.H., Liberati N.T., Ausubel F.M., y O'Toole G.A.** (2007). BifA, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* **189**: 8165-8178.
- Kuiper I., Bloemberg G.V., y Lugtenberg B.J.J.** (2001). Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 1197-1205.
- Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V., y Lugtenberg B.J.** (2004). Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**: 6-15.
- Kulasakara H., Lee V., Brencic A., Liberati N., Urbach J., Miyata S., Lee D.G., Neely A.N., Hyodo M., Hayakawa Y., Ausubel F.M., y Lory S.** (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 2839-2844.
- Lam S.T., Ellis D.M., y Ligon J.M.** (1990). Genetic approaches for studying rhizosphere colonization. *Plant Soil.* **129**: 11-18.
- Lambrecht M., Okon Y., Vande Broek A., y Vanderleyden J.** (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* **8**: 298-300.
- Lasa I.** (2006). Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int. Microbiol.* **9**: 21-28.
- Latasa C., Roux A., Toledo-Arana A., Ghigo J., Gamazo C., Penades J., y Lasa I.** (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol. Microbiol.* **58**: 1322-1339.

- Lazăr V., y Chifiriuc M.C.** (2010). Architecture and physiology of microbial biofilms. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* **69**: 95-107.
- Lee S.W., y Cooksey D.A.** (2000). Genes expressed in *Pseudomonas putida* during colonization of a plant-pathogenic fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2764-2772.
- Leeman M., Den Ouden F.M., Van Pelt J.A., Dirkx F.P.M., Steijl H., Bakker P.A.H.M., y Schippers B.** (1996). Iron availability affects induction of systemic resistance to Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology.* **86**: 149-155.
- Leisinger T., y Margraff R.** (1979). Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiological Review.* **43**: 422-442.
- Lemanceau P., Bakker P.A.H.M., de Kogel W.J., Alabouvette C., y Schippers B.** (1992). Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of fusarium wilt of carnation by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2978-2982.
- Lerouge I., y Vanderleyden J.** (2002). O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 17-47.
- Levi A., y Jenal U.** (2006). Holdfast formation in motile swarmer cells optimizes surface attachment during *Caulobacter crescentus* development. *J. Bacteriol.* **188**: 5315-5318.
- Liaw Y.C., Gao Y.G., Robinson H., Sheldrick G.M., Slidregt L.A., van der Marel G.A., van Boom J.H., y Wang A.H.** (1990). Cyclic diguanylic acid behaves as a host molecule for planar intercalators. *FEBS Lett.* **264**: 223-227.
- Ligon J.M., Hill D.S., Hammer P.E., Torkewitz N.R., Hofmann D., Kempf H.J., y van Pee K.H.** (2000). Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Man. Sci.* **56**: 688-695.
- Lim B., Beyhan S., Meir J., y Yildiz F.H.** (2006). Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: modulation of rugosity and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **60**: 331-348.
- Linderman R.G.** (1988). Mycorrhizal interactions with the rhizosphere micro-flora: The mycorrhizosphere effect. *Phytopathology.* **78**: 366-371.
- Linderman R.G.** (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Special Publication (eds Bethlenfalvay G.J., y Linderman R.G.) American Society of Agronomy. Madison, WI: ASA. **54**: 45-70.
- Lioussanne L., Jolicoeur M., y St-Arnaud M.** (2009). The effects of arbuscular mycorrhizal fungi, of root exudates from mycorrhizal plants and of the soilborne pathogen *Phytophthora nicotianae* on the bacterial community structure of tomato rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **42**: 473-483.
- Liu S., y Suflita J.M.** (1993). Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends Biotechnol.* **11**: 344-352.
- Liu X.Y., y Matsumura P.** (1994). The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J. Bacteriol.* **176**: 7345-7351.
- Liu S., Hu X., Lohrke S.M., Baker C.J., Buyer J.S., de Souza J.T., y Roberts D.P.** (2007). Role of *sdhA* and *pfkA* and catabolism of reduced carbon during colonization of cucumber roots by *Enterobacter cloacae*. *Microbiol.* **153**: 3197-3210.

- Lloyd S.A., Tang H., Wang X., Billings S., y Blair D.F.** (1996). Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FlhG but not for FlhM or FlhN. *J. Bacteriol.* **178**: 223-231.
- Loake G.J., Ashby A.M., y Shaw C.H.** (1988). Attraction of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 towards sugars involves a highly sensitive chemotaxis system. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 1427-1432.
- Loper J.E., y Henkels M.D.** (1999). Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5357-5363.
- López-Bucio J., Campos-Cuevas J.C., Hernández-Calderón E., Velásquez-Becerra C., Farías-Rodríguez R., Macías-Rodríguez L.I., y Valencia-Cantero E.** (2007). *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**: 207-217.
- Lugtenberg B.J., y Dekkers L.C.** (1999). What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environ. Microbiol.* **1**: 9-13.
- Lugtenberg B.J., Dekkers L.C., y Bloemberg G.V.** (2001). Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **39**: 461-490.
- Lugtenberg B.J., Chin-A-Woeng T.F., y Bloemberg G.V.** (2002). Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **81**: 373-383.
- Lugtenberg B.J.J., y Bloemberg G.V.** (2004). Life in the rhizosphere. In: *Pseudomonas* (eds Ramos J.L.) New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers. **1**: 403-430.
- Lugtenberg B., y Kamilova F.** (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 541-556.
- Lynch J.M.** (1987). Soil biology – accomplishments and potential. *Soil Science Society of America Journal.* **51**: 1409-1412.
- Ma J.F., Phibbs P.V., y Hassett D.J.** (1997). Glucose stimulates alginate production and *algD* transcription in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **148**: 217-221.
- Macnab R.M.** (1999). The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *J. Bacteriol.* **181**: 7149-7153.
- Macnab R.M.** (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 77-100.
- Mah T.F., Pitts B., Pellock B., Walker G.C., Stewart P.S., y O'Toole G.A.** (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature.* **426**: 306-310.
- Mahajan A., Currie C.G., Mackie S., Tree J., McAteer S., McKendrick I., McNeilly T.N., Roe A., La Ragione R.M., Woodward M.J., Gally D.L., y Smith D.G.** (2009). An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157: H7 with bovine intestinal epithelium. *Cell Microbiol.* **11**: 121-137.
- Mahan M.J., Slauch J.M., y Mekalanos J.J.** (1993). Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science.* **259**: 666-668.
- Maier R.M., Pepper I.L., y Gerba C.P.** (2000) Environmental Microbiology. (Academic Press Inc) pp 585.
- Makin S.A., y Beveridge T.J.** (1996). The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology.* **142**: 299-307.

- Manos J., Curtis M., Tingpej P., Arthur J., Rose B., Bye P.T., y Harbour C.** (2007). Enhanced biofilm formation and downregulation of gene expression are features of a transmissible *Pseudomonas aeruginosa* clone from cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulm.* **42**: S30.
- Marco M.L., Legac J., y Lindow S.E.** (2003). Conditional survival as a selection strategy to identify plant-inducible genes of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5793-5801.
- Marco M.L., Legac J., y Lindow S.E.** (2005). *Pseudomonas syringae* genes induced during colonization of leaf surfaces. *Environ. Microbiol.* **7**: 1379-1391.
- Mark G.L., Dow J.M., Kiely P.D., Higgins H., Haynes J., Baysse C., Abbas A., Foley T., Franks A., Morrissey J., y O'Gara F.** (2005). Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 17454-17459.
- Marks G.C., y Kozlowski T.T.** (1973). Ectomycorrhizae: their ecology and physiology. *Academic Press*. New York and London. pp. 444.
- Marschner P., Yang C.H., Lieberei R., y Crowley D.E.** (2001). Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 1437-1445.
- Marschner P., y Timonen S.** (2005). Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Appl. Soil Ecol.* **28**: 23-36.
- Martínez-Gil M., Yousef-Coronado F., y Espinosa-Urgel M.** (2010). LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Mol. Microbiol.* **77**: 549-561.
- Martínez-Granero F., Capdevila S., Sánchez-Contreras M., Martín M., y Rivilla R.** (2005). Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol.* **151**: 975-983.
- Martínez-Granero F., Rivilla R., y Martín M.** (2006). Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3429-3434.
- Martinez-Wilson H.F., Tamayo R., Tischler A.D., Lazinski D.W., y Camilli A.** (2008). The *vibrio cholerae* hybrid sensor kinase VieS contributes to motility and biofilm regulation by altering the cyclic diguanylate level. *J. Bacteriol.* **190**: 6439-6447.
- Matilla M.A., Espinosa-Urgel M., Rodriguez-Herva J.J., Ramos J.L. y Ramos-Gonzalez M.I.** (2007). Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biology.* **8**: R179.
- Maurhofer M., Reimann C., Schmidli-Sacherer P., Heeb S., Haas D., y Défago G.** (1998). Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology.* **88**: 678-684.
- Mercado-Blanco J., y Bakker P.A.H.M.** (2007). Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek.* **92**: 367-389.
- Merkel T.J., Barros C., y Stibitz S.** (1998). Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* **180**: 1682-1690.

- Merritt J.H., Brothers K.M., Kuchma S.L., y O'Toole G.A.** (2007). SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J. Bacteriol.* **189**: 8154-8164.
- Meziane H., Van Der Sluis I., Van Loon L.C., Höfte M., Bakker P.A.H.M.** (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.* **6**: 177-185.
- Miller L.D., Yost C.K., Hynes M.H., y Alexandre G.** (2007). The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is essential for competitive nodulation. *Mol. Microbiol.* **63**: 348-362.
- Moenne-Loccoz Y., Tichy H.V., O'Donnell A., Simon R., y O'Gara F.** (2001). Impact of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 on intraspecific diversity of resident culturable fluorescent pseudomonads associated with the roots of field-grown sugar beet seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3418-3425.
- Montie T.C., Doyle-Huntzinger D., Craven R.C., y Holder I.A.** (1982). Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. *Infect. Immun.* **38**: 1296-1298.
- Morgan J.A., Bending G.D., y White P.J.** (2005). Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany.* **56**: 1729-1739.
- Nadell C.D., Xavier J.B., y Foster K.R.** (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 206-224.
- Nakayama T., Homma Y., Hashidoko Y., Mizutani J., y Tahara S.** (1999). Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 4334-4339.
- Naseby D.C., y Lynch J.M.** (1999). Effects of *Pseudomonas fluorescens* F113 on ecological functions in the pea rhizosphere are dependent on pH. *Microb. Ecol.* **37**: 248-256.
- Navazo A., Barahona E., Redondo-Nieto M., Martínez-Granero F., Rivilla R., y Martín M.** (2009). Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microb. Biotechnol.* **2**: 489-498.
- Nunan N., Daniell T.J., Singh B.K., Papert A., McNicol J.W., y Prosser J.I.** (2005). Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 6784-6792.
- Ojanen-Reuhs T., Kalkkinen N., Westerlund-Wikstrom B., van Doorn J., Haahtela K., Nurmiäho-Lassila E.L., Wengelnik K., Bonas U., y Korhonen T.K.** (1997). Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **179**: 1280-1290.
- Okon Y., Gakmakgi L., Nur I., y Chet I.** (1980). Aerotaxis and chemotaxis of *Azospirillum brasilense*. *Microb. Ecol.* **6**: 277-280.
- Oldeman L.R.** (1994). The Global Extent of Soil Degradation. In: *Soil Resilience and Sustainable Land Use* (eds Greenland D.J., y Szaboles T.). CAB International, Wallingford, U.K. pp. 99-119.



- Ongena M., Daayf F., Jacques P., Thonart P., Benhamou N., Paulitz T., Cornelis P., Koedam N., Belanger R.R. (1999). Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathol.* **48**: 66-76.
- Ormeño-Orrillo E., Rosenblueth M., Luyten E., Vanderleyden J., y Martínez-Romero E. (2008). Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Environ. Microbiol.* **10**: 1271-1284.
- Ortíz-Castro R., Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., y López-Bucio J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling and Behavior.* **4**: 701-712.
- O'Toole G.A., y Kolter R. (1998a). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**: 295-304.
- O'Toole G.A., y Kolter R. (1998b). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**: 449-461.
- O'Toole G.A., Kaplan H.B., y Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 49-79.
- Pal S.S. (1998). Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. *Plant Soil.* **198**: 169-177.
- Parke D., Ornston L.N., y Nester E.W. (1987). Chemotaxis to plant phenolic inducers of virulence genes is constitutively expressed in the absence of the Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **169**: 5336-5338.
- Parsek M.R., y Greenberg E.P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* **13**: 27-33.
- Paul E.A., y Clark F.E. (1989). *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. San Diego, California, USA.
- Paul R., Weiser S., Amiot N.C., Chan C., Schirmer T., Giese B., y Jenal U. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev.* **18**: 715-727.
- Pei J., y Grishin N.V. (2001). GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. *Proteins.* **42**: 210-216.
- Pesavento C., Becker G., Sommerfeldt N., Possling A., Tschowri N., Mehlis A., y Hengge R. (2008). Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **22**: 2434-2446.
- Pieterse C.M.J., Van Wees S.C.M., Van Pelt J.A., Knoester M., Laan R., Gerrits N., Weisbeek P.J., y Van Loon L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell.* **10**: 1571-1580.
- Pliego C., Cazorla F.M., González-Sánchez M.A., Pérez-Jiménez R.M., de Vicente A., y Ramos C. (2007). Selection of biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. *Research in Microbiology.* **158**: 463-470.

- Poonguzhali S., Madhaiyan M., Yim W.J., Kim K.A., y Sa T.M.** (2008). Colonization pattern of plant root and leaf surfaces visualized by use of green-fluorescent-marked strain of *Methylobacterium suomiense* and its persistence in rhizosphere. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**: 1033-1043.
- Pratt L.A., y Kolter R.** (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30**: 285-293.
- Preston G.M.** (2004). Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **359**: 907-918.
- Pretty J.N., y Shah P.** (1997). Making soil and water conservation sustainable: From coercion and control to partnerships and participation. *Land Degradation and Development.* **8**: 39-58.
- Powell C.L.I.** (1982). Selection of efficient vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil.* **68**: 3-9.
- Raaijmakers J.M., Leeman M., Van Oorschot M.M.P., Van der Sluis I., Schippers B., y Bakker P.A.H.M.** (1995). Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology.* **85**: 1075-1081.
- Raaijmakers J.M., Vlami M., y de Souza J.T.** (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **81**: 537-547.
- Raaijmakers J.M., Paulitz T.C., Steinberg C., Alabouvette C., y Moenne-Loccoz Y.** (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil.* **321**: 341-361.
- Ramos-Gonzalez M.I., Campos M.J., y Ramos J.L.** (2005). Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: in vitro expression technology capture and identification of root-activated promoters. *J. Bacteriol.* **187**: 4033-4041.
- Ran L.X., Li Z.N., Wu G.J., Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M.** (2005). Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Eur. J. Plant Pathol.* **113**: 59-70.
- Rainey P.B.** (1999). Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environ. Microbiol.* **1**: 243-257.
- Rediers H., Bonnecarrere V., Rainey P.B., Hamonts K., Vanderleyden J., y De Mot R.** (2003). Development and application of a *dapB*-based in vivo expression technology system to study colonization of rice by the endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A15. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6864-6874.
- Rezzonico F., Zala M., Keel C., Duffy B., Moënné-Loccoz Y., y Défago G.** (2007). Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? *New Phytologist.* **173**: 861-872.
- Richter D.D., y Markewitz D.** (1995). How deep is soil? *Bioscience.* **45**: 600-609.
- Roberts D.P., Dery P.D., Yucel I., Buyer J.S., Holtman M.A., y Kobayashi D.Y.** (1999). Role of *pfkA* and general carbohydrate catabolism in seed colonization by *Enterobacter cloacae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2513-2519.
- Rodriguez-Herva J.J., Duque E., Molina-Henares M.A., Navarro-Aviles G., van Dillewijn P., de la Torre J., Molina-Henares A.J., Sanchez-de la Campa A., Ran F.A., Segura A., Shingler V., y Ramos J.L.** (2010).

- Physiological and transcriptomic characterization of a *fliA* mutant of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol. Reports*. **2**: 373-380.
- Roine E., Raineri D.M., Romantschuk M., Wilson M., y Nunn D.N.** (1998). Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 1048-1056.
- Rosenberg E.** (1993). Exploiting microbial growth on hydrocarbons-new markets. *Tibtech*. **11**: 419-424.
- Ross P., Weinhouse H., Aloni Y., Michaeli D., Weinberger-Ohana P., Mayer R., Braun S., de Vroom E., van der Marel G.A., van Boom J.H., y Benziman M.** (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*. **325**: 279-281.
- Rovira A.D.** (1973). Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of microorganisms in the rhizosphere. *Pestic. Sci.* **4**: 361-366.
- Rovira A.D., y Campbell R.** (1975). A scanning electron microscope study of interactions between microorganisms and *Gaeumannomyces graminis* (Syn. *Ophiobolus graminis*) on wheat roots. *Microbe Ecol.* **2**: 177-185.
- Rovira A.D.** (2005). Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. *Plant Soil*. **7**: 178-194.
- Roy K., Hilliard G.M., Hamilton D.J., Luo J., Ostmann M.M., y Fleckenstein J.M.** (2009). Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature*. **457**: 594-598.
- Rudrappa T., Biedrzycki M.L., y Bais H.P.** (2008). Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **64**: 153-166.
- Ryjenkov D.A., Tarutina M., Moskvina O.V., y Gomelsky M.** (2005). Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J. Bacteriol.* **187**: 1792-1798.
- Salaün L., Snyder L.A., y Saunders N.J.** (2003). Adaptation by phase variation in pathogenic bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* **52**: 263-301.
- Sánchez-Contreras M., Martín M., Villaceros M., O'Gara F., Bonilla I., y Rivilla R.** (2002). Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* **184**: 1587-1596.
- Sanders F.E., Mosse B., y Tinker P.B.** (1975). Endomycorrhizas. Academic Press. New York. pp. 626.
- Saunders N.J., Moxon E.R., y Gravenor M.B.** (2003). Mutation rates: estimating phase variation rates when fitness differences are present and their impact on population structure. *Microbiol.* **149**: 485-495.
- Saxena P.K., Krishnaraj S., Dan T., Perras M.R., y Vettaakkorumakankav N.N.** (1999). Phytoremediation of heavy metal contaminated and polluted soils. In: Heavy Metal Stress in Plants: from Molecules to Ecosystems (eds Prasad M.N.V., y Hagemeyer J.) Springer, Berlin. pp. 305-329.
- Schembri M.A., Kjaergaard K., y Klemm P.** (2003). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* **48**: 253-267.
- Scher F.M., Kloepper J.W., Singleton C., Zaleski I., y Laliberte M.** (1988). Colonization of soybean roots by *Pseudomonas* and *Serratia* species: relationship to bacterial motility, chemotaxis and generation time. *Phytopathology*. **78**: 1055-1059.

- Schippers A.B., Bakker A.W., y Bakker P.A.H.M.** (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25**: 339-358.
- Schuhegger R., Ihring A., Gantner S., Bahnweg G., Knappe C., Vogg G., Hutzler P., Schmid M., Van Breusegem F., Eberl L., Hartmann A., y Langebartels C.** (2006). Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ.* **29**: 909-918.
- Schulz S., y Dickschat J.S.** (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat. Prod. Rep.* **24**: 814-842.
- Schwab A.P., y Banks M.K.** (1994). Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. In: *Bioremediation through rhizosphere technology* (eds Anderson T.A., y Coats J.R.) American Chemical Society, Washington, DC. pp. 132-141.
- Shanahan P., O'Sullivan D.J., Simpson P., Glennon J.D., y O'Gara F.** (1992). Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 353-358.
- Simm R., Morr M., Kader A., Nimtz M., y Römmling U.** (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol. Microbiol.* **53**: 1123-1134.
- Simm R., Fetherston J.D., Kader A., Römmling U., y Perry R.D.** (2005). Phenotypic convergence mediated by GGDEF-domain-containing proteins. *J. Bacteriol.* **187**: 6816-6823.
- Simons M., van der Bij A.J., Brand I., de Weger L.A., Wijffelman C.A., y Lugtenberg B.J.J.** (1996). Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 600-607.
- Simons M., Permentier H.P., de Weger L.A., Wijffelman C.A., y Lugtenberg B.J.J.** (1997). Amino acid synthesis is necessary for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 102-106.
- Singh S., y Kapoor K.K.** (1999). Inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biol. Fert. Soils.* **28**: 139-144.
- Smith S.E., y Read D.J.** (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. London. pp. 605.
- Sorensen J.** (1997). The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. In: *Modern Soil Microbiology* (eds Van Elsas J.D., Trevors J.T., y Wellington E.M.H.). Marcel Dekker Inc. New York. pp. 21-45.
- Sorensen J., Jensen L.E., y Nybroe O.** (2001). Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas* inoculants: New knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single-cell studies. *Plant Soil.* **232**: 97-108.
- Sourjik V., Sterr W., Platzer J., Bos I., Haslbeck M., y Schmitt R.** (1998). Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene.* **223**: 283-290.
- Sourjik V., Muschler P., Scharf B., y Schmitt R.** (2000). VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*. *J. Bacteriol.* **182**: 782-788.

- Soutourina O., Kolb A., Krin E., Laurent-Winter C., Rimsky S., Danchin A., y Bertin P.** (1999). Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of HNS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J. Bacteriol.* **181**: 7500-7508.
- Spaepen S., Versées W., Gocke D., Pohl M., Steyaert J., y Vanderleyden J.** (2007). Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **189**: 7626-7633.
- St-Arnaud M., y Vujanovic V.** (2007). Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant diseases and pests. In: Mycorrhizae in crop production: applying knowledge (eds Hamel C., y Plenchette C.). Haworth, Binghampton, New York. pp. 67-122.
- Steenhoudt O., y Vanderleyden J.** (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 487-506.
- Stella N.A., Kalivoda E.J., O'Dee D.M., Nau G.J., y Shanks R.M.** (2008). Catabolite repression control of flagellum production by *Serratia marcescens*. *Res. Microbiol.* **159**: 562-568.
- Stewart P.S.** (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**: 107-113.
- Sticher L., Mauch-Mani B., y Metraux J.P.** (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Plant Pathol.* **35**: 235-270.
- Tamayo R., Pratt J.T., y Camilli A.** (2007). Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 131-148.
- Tart A.H., Wolfgang M.C., y Wozniak D.J.** (2005). The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of *fleQ*. *J. Bacteriol.* **187**: 7955-7962.
- Tatusov R.L., Natale D.A., Garkavtsev I.V., Tatusova T.A., Shankavaram U.T., Rao B.S., Kiryutin B., Galperin M.Y., Fedorova N.D., y Koonin E.V.** (2001). The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.* **29**: 22-28.
- Thomashow L.S., y Weller D.M.** (1990). Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. *Plant Soil.* **129**: 93-99.
- Thomashow L.S.** (1996). Biological control of plant root pathogens. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 343-347.
- Thomashow L.S., Bonsall R.F. y Weller D.M.** (1997). Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. In: Manual of Environmental Microbiology (eds Hurst C.J., Knudsen G.R.M.J., McInerney L., Stetzenbach D., y Walter M.V.) American Society for Microbiology Press, Washington, D.C. pp. 493-499.
- Thormann K.M., y Paulick A.** (2010). Tuning the flagellar motor. *Microbiol.* **156**: 1275-1283.
- Tischler A.D., y Camilli A.** (2004). Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **53**: 857-869.
- Torres A.G., Jeter C., Langley W., y Matthyse A.G.** (2005). Differential binding of *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa, human epithelial cells, and plastic is mediated by a variety of surface structures. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8008-8015.
- Torvisk V., Salte K., Sorheim R., y Goksöyr J.** (1990). Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 776-781.

- Torvisk V., Sorheim R., y Goksoyr J.** (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities. *Journal of Industrial Microbiology*. **17**: 170-178.
- Trotta A., Vanese G.C., Gnani E., Fascon A., Sampo S., y Berta G.** (1996). Interaction between the soilborne root pathogen *Phytophthora nicotianae* Var *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plant. *Plant Soil*. **185**: 199-209.
- Uren N.C.** (2000). Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil grown plants. In: *The Rhizosphere: Biochemistry, and Organic Substances at the Soil Interface* (eds Pinton R., Varani Z., y Nanniperi P.). Marcel Dekker Inc., New York. pp. 19-40.
- Van-Camp L., Bujarrabal B., Gentile A.R., Jones R.J.A., Montanarella L., Olazabal C., y Selvaradjou S.K.** (2004). Parameters, indicators and harmonization. In: *Reports of the Technical Working Groups Established under the Thematic Strategy for Soil Protection* (eds Van-Camp L., Bujarrabal B., Gentile A.R., Jones R.J.A., Montanarella L., Olazabal C., y Selvaradjou S.K. ). Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. **5**: 653-718.
- Van de Broek A., Lambrecht M., y Vanderleyden J.** (1998). Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Microbiol.* **144**: 2599-2606.
- Van den Broek D., Chin-A-Woeng T.F.C., Eijkemans K., Mulders I.H., Bloemberg G.V., y Lugtenberg B.J.J.** (2003). Biocontrol traits of *Pseudomonas* spp. are regulated by phase variation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 1003-1012.
- van den Broek D., Bloemberg G.V., y Lugtenberg B.** (2005). The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environ. Microbiol.* **7**: 1686-1697.
- van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., y Pieterse C.M.J.** (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 453-483.
- van Loon L.C.** (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant. Pathol.* **119**: 243-225.
- Van Peer R., Niemann G.J., y Schippers B.** (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology*. **81**: 728-734.
- Van Peer R., y Schippers B.** (1992). Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to fusarium wilt. *Neth. J. Plant Pathol.* **98**: 129-139.
- Vander Wauven C., Piérard A., Kley-Raymann M., y Haas D.** (1984). *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J. Bacteriol.* **160**: 928-934.
- Van Wees S.C., De Swart E.A., Van Pelt J.A., Van Loon L.C., y Pieterse C.M.J.** (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**: 8711-8716.
- Vasseur P., Vallet-Gely I., Soscia C., Genin S., y Filloux A.** (2005). The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology*. **151**: 985-997.

- Vesper S.J.** (1987). Production of pili (fimbriae) by *Pseudomonas fluorescens* and correlation with attachment to corn roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1397-1405.
- Vessey J.K.** (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* **255**: 571-586.
- Vigo C., Norman J.R., y Hooker J.E.** (2000). Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on infection loci. *Plant Pathol.* **49**: 509-514.
- Villacieros M.** (2000). Diseño de un sistema integrado planta/microorganismo para su uso en biorremediación. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Villacieros M., Power B., Sánchez-Contreras M., Lloret J., Oruezabal R.I., Martín M., Fernández-Piñas F., Bonilla C., Dowling D.N., y Rivilla R.** (2003). Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. *Plant Soil.* **251**: 47-54.
- Villacieros M., Whelan C., Mackova M., Molgaard J., Sánchez-Contreras M., Lloret J., Aguirre de Cárcer D., Oruezabal R.I., Bolaños L., Macek T., Karlson U., Dowling D.N., Martín M., y Rivilla R.** (2005). Polychlorinated biphenyl rhizoremediation by *Pseudomonas fluorescens* F113 derivatives, using a *Sinorhizobium meliloti* nod system to drive *bph* gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2687-2694.
- Vincent M.N., Harrison L.A., Brackin J.M., Kovacevich P.A., Mukerji P., Weller D.M., y Pierson E.A.** (1991). Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2928-2934.
- Vlamakis H., Aguilar C., Losick R., y Kolter R.** (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev.* **22**: 945-953.
- Volpin H., Burdman S., Castro-Sowinski S., Kapulnik T., y Okon Y.** (1996). Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of rhizobial *nod*-gene inducers by alfalfa roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 388-394.
- Wada T., Morizane T., Abo T., Tominaga A., Inoue-Tanaka K., y Kutsukake K.** (2011). EAL domain protein YdiV acts as an anti-FlhD4C2 factor responsible for nutritional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *J. Bacteriol.* **193**: 1600-1611.
- Wall D., y Kaiser D.** (1999). Type IV pili and cell motility. *Mol. Microbiol.* **32**: 1-10.
- Wang Y., Brown H.N., Crowley D.E., y Szaniszló P.J.** (1993). Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. *Plant Cell Environ.* **16**: 579-585.
- Wardle D.A., Walker L.R., y Bardgett R.D.** (2004). Ecosystem properties and forest decline in contrasting long-term chronosequences. *Science.* **305**: 509-513.
- Watt M., Hugenholtz P., White R., y Vinall K.** (2006). Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Environ. Microbiol.* **8**: 871-884.
- Weber H., Pesavento C., Possling A., Tischendorf G., y Hengge R.** (2006). Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **62**: 1014-1034.
- Wei G., Kloepper J.W., y Tuzun S.** (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology.* **81**: 1508-1512.

- Weller D.M., Van Pelt J.A., Mavrodi D.V., Pieterse C.M.J., Bakker P.A.H.M., y Van Loon L.C.** (2004). Induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*. **94**: S108.
- Weller D.M.** (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*. **97**: 250-256.
- Wenzel W.W., Lombi E., y Adriano D.C.** (1999). Biochemical processes in the rhizosphere: role in phytoremediation of metal-polluted soils. In: *Heavy Metal Stress in Plants: from Molecules to Ecosystems* (eds Prasad M.N.V., y Hagemeyer J.) Springer, Berlin. pp. 273-303.
- Whipps J.M.** (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can. J. Bot.* **82**: 1198-1227.
- Whitchurch C.B., Hobbs M., Livingston S.P., Krishnapillai V., y Mattick J.S.** (1991). Characterisation of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility gene and evidence for a specialised protein export system widespread in eubacteria. *Gene*. **101**: 33-44.
- Whitehead N.A., Barnard A.M., Slater H., Simpson N.J., y Salmond G.P.** (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 365-404.
- Williams V., y Fletcher M.** (1996). *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 100-104.
- Winslow C.E., Broadhurst J., Buchanan R.E., Krumwiede C., Rogers L.A., y Smith G.H.** (1917). The Families and Genera of the Bacteria: Preliminary Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. *J. Bacteriol.* **2**: 505-566.
- Wu C.H., Wood T.K., Mulchandani A., y Chen W.** (2006). Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1129-1134.
- Xu K.D., Stewart P.S., Xia F., Huang C.T., y McFeters G.A.** (1998). Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microb.* **64**: 4035-4039.
- Yao J., y Allen C.** (2006). Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol.* **188**: 3697-3708.
- Yee D.C., Maynard J.A., y Wood T.K.** (1998). Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene ortho-monooxygenase constitutively. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 112-118.
- Yousef-Coronado F., Travieso M.L., y Espinosa-Urgel M.** (2008). Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **288**: 118-124.
- Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E.J., Jones J.D.G., Felix G., y Boller T.** (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*. **428**: 764-767.





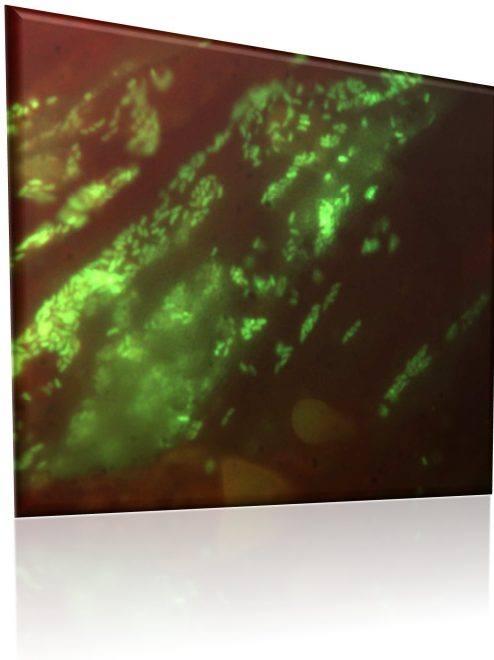


## OBJETIVOS

En los últimos años, nuestro grupo de trabajo se ha centrado en el estudio de la movilidad dependiente de flagelos y del fenómeno de variación de fase en *P. fluorescens* F113. Ambos factores han sido descritos como caracteres muy importantes para que las bacterias puedan colonizar y adaptarse a nuevos ambientes. En *P. fluorescens* F113, cepa colonizadora de la rizosfera de diferentes tipos de plantas de interés agrícola y que se ha definido como agente de biocontrol de hongos patógenos, se había observado que mutantes inmóviles o con capacidad de movimiento reducida, presentaban problemas en el proceso de colonización competitiva. Por el contrario, variantes fenotípicos seleccionados por la presión selectiva del ambiente rizosférico, eran cepas más competitivas. Todos estos variantes espontáneos se caracterizaban por ser mutantes en el sistema de dos componentes GacA/GacS, pero además presentaban mutaciones adicionales que les conferían una mayor movilidad, indicando que el movimiento es un carácter cuantitativo y multigénico. La realización de una mutagénesis por transposición al azar, permitió identificar varios represores de la movilidad en *P. fluorescens* F113. Los mutantes simples y múltiples en estos genes, presentaban una movilidad tipo *swimming* mucho mayor que la de F113, además de ser cepas que colonizaban eficazmente la rizosfera. Como consecuencia de estos resultados, quisimos profundizar en el análisis de estos mutantes, estudiando posibles fenotipos que implicaran cepas con mayor atractivo para ser utilizadas en sistemas integrados planta-microorganismo como agentes de biocontrol y de rizadorremediación. Para ello, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Determinar la capacidad de colonización competitiva de mutantes hipermóviles derivados de *P. fluorescens* F113, así como estudiar y comparar los patrones de colonización de estos mutantes y la cepa silvestre.
2. Determinar la capacidad de biocontrol ejercido por cepas más competitivas.
3. Analizar la importancia de la expresión de un segundo flagelo en la colonización competitiva de la rizosfera, así como estudiar e identificar nuevos genes y rutas implicados en la regulación del mismo.





## ***CAPÍTULO 2***

---

**Mutantes de *Pseudomonas fluorescens* F113 afectados en la formación de biopelículas en superficies abióticas colonizan eficientemente la rizosfera.**



## RESUMEN

La movilidad es un factor clave en el proceso de colonización de la rizosfera por parte de *Pseudomonas fluorescens* F113. Mutantes inmóviles, o que presentan reducida su movilidad, son malos competidores, mientras que cepas hipermóviles y variantes fenotípicas seleccionados en la rizosfera, colonizan competitivamente la raíz. El movimiento dependiente de flagelos, está asociado a un modo de vida libre de las bacterias, a un estilo de vida planctónico, y además, es necesario para que se lleven a cabo los pasos iniciales en la formación de biopelículas. Para estudiar la relación que existe entre la formación de biopelículas y la colonización de la rizosfera, hemos utilizado tanto variantes fenotípicas hipermóviles como mutantes en genes reguladores que en otras bacterias están implicados en el desarrollo de las biopelículas: *gacS* (G), *sadB* (S) y *wspR* (W). Todos los mutantes afectados en estos genes, así como el variante hipermóvil (V35) aislado de la rizosfera, estaban afectados en la formación de biopelículas en superficies abióticas. Sin embargo, todas estas cepas colonizan el ápice de la raíz de manera similar a la cepa silvestre, lo que indica que estos dos procesos transcurren por diferentes rutas de regulación en *P. fluorescens*. Además, el triple mutante *gacSsadBwspR* (GSW) y el variante fenotípico V35, fueron capaces de desplazar a la cepa silvestre en estudios de colonización competitiva de la rizosfera, sugiriendo que la movilidad podría ser más importante que la formación de biopelículas en superficies abióticas, en este tipo de ambientes. Los análisis de microscopía mostraron que tanto *P. fluorescens* F113 como el conjunto de mutantes hipermóviles, mostraban un patrón similar de colonización de la raíz: grupos aislados de microcolonias dispuestas en el rizoplaneo y cubiertas por un mucigel producido por la planta. Por tanto, la capacidad de formar biopelículas no está necesariamente relacionada con una colonización eficiente o colonización competitiva de la rizosfera.

## INTRODUCCIÓN

La rizosfera se define como la región de suelo que está influenciada por la raíces de las plantas. Esta zona se caracteriza por presentar un elevado número de microorganismos, muy superior al existente en la zona del suelo no influenciada (Hiltner, 1904). Las rizobacterias, que están perfectamente adaptadas a este ecosistema, son capaces de afectar al estado general de la planta. Por este motivo, estos organismos, resultan realmente importantes en las aplicaciones biotecnológicas basadas en los sistemas integrados planta-microorganismo. En el grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes se incluyen varias especies de rizobacterias que han sido utilizadas como cepas modelo tanto en estudios de colonización de la rizosfera (Lugtenberg y Dekkers, 1999; Lugtenberg y col., 2001), como en aplicaciones para el biocontrol de patógenos (Haas y Defago, 2005) y la biorremediación de contaminantes del suelo (Yee y col., 1998). *Pseudomonas fluorescens* F113 fue aislada de la rizosfera de remolacha. Esta cepa bacteriana presenta la capacidad de proteger a las plantas de la acción del hongo patógeno *Pythium ultimum* mediante la producción del fungicida 2,4-Diacetilfloroglucinol (DAPG) (Shanahan y col., 1992). Además, ha sido objeto de modificaciones genéticas que le permiten degradar PCBs y por tanto se ha analizado su capacidad como bacteria para biorremediación (Aguirre de Cárcer y col., 2007a, Aguirre de Cárcer y col., 2007b; Brazil y col., 1995; Villaceros y col., 2005). Además, *P. fluorescens* F113 coloniza eficientemente la rizosfera de una amplia variedad de plantas, incluyendo guisante (Naseby y Lynch, 1998), tomate (Dekkers y col., 2000), sauce (Aguirre de Cárcer y col., 2007a) y alfalfa (Villaceros y col., 2003). Los estudios de colonización en alfalfa revelaron que esta bacteria se dispone en el rizoplaneo (superficie de la raíz), formando microcolonias a lo largo de éste (Villaceros y col., 2003) y que el patrón de colonización era muy similar al anteriormente descrito en otras *Pseudomonas* fluorescentes en las raíces de tomate (Chin-A-Woeng y col., 1997).

Los niveles celulares del segundo mensajero di-GMP controlan la transición entre dos estilos de vida bacterianos totalmente opuestos: un estilo de vida sésil, en el que las bacterias se disponen formando biopelículas, y un estado de vida móvil o planctónico. Estos niveles están regulados por proteínas que contienen dominios con actividad diguanilato ciclasa (dominios GGDEF) y/o fosfodiesterasa (dominios EAL o HD-GYP) (para una reciente revisión mirar Hengge, 2009). Bajos niveles de di-GMP están asociados con un estilo de vida libre, mientras que altos niveles de este segundo mensajero conducen a la disminución de la movilidad y a la formación de biopelículas.



Aunque los flagelos son requeridos para los primeros pasos del proceso de formación de biopelículas (acoplamiento inicial de las células a la superficie) (O'Toole y Kolter, 1998a), la movilidad mediada por flagelos puede definirse como un estilo de vida opuesto a la formación de biopelículas. De hecho, la expresión de genes flagelares en *P. aeruginosa* o *Bacillus subtilis* deriva en la incapacidad de formar biopelículas (Lazazzera, 2005). En *P. fluorescens* y otras bacterias, la movilidad es uno de los factores más importantes requeridos para la colonización de la rizosfera. Mutantes inmóviles o deficientes en quimiotaxis se encuentran entre los más afectados en el proceso de colonización (de Weert y col., 2002), y también se ha descrito que en *P. fluorescens*, son necesarios los niveles de movilidad que presenta la cepa silvestre para que tenga lugar una colonización competitiva de la rizosfera (Capdevila y col., 2004). El hecho de que la movilidad sea una característica imprescindible para la colonización de la raíz por *P. fluorescens*, se confirma cuando se descubre que en la rizosfera se seleccionan variantes fenotípicos (Sánchez- Contreras y col., 2002), los cuales presentan mutaciones en el sistema de dos componentes GacA/GacS, además de en otros genes desconocidos, lo que conduce a fenotipos hipermóviles (Martínez-Granero y col., 2006).

En este trabajo hemos utilizado, tanto variantes fenotípicos hipermóviles aislados de la rizosfera, como mutantes hipermóviles afectados en los genes *gacS*, *sadB* y *wspR* (implicados en la formación de biopelículas), con el objetivo de analizar su importancia en la colonización y colonización competitiva de la rizosfera.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento.

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio han sido anteriormente descritas: *P. fluorescens* F113 (Shanahan y col., 1992), mutantes hipermóviles derivados de F113 (Navazo y col., 2009) y el variante fenotípico (V35) (Martínez-Granero y col., 2006).

Todas estas cepas se cultivaron en medio SA (Sacarosa-Asparragina) (Scher y Baker, 1982) (Tabla 2.1) con agar purificado al 1.5% (Pronadisa, España), suplementado con  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . En los procesos de conjugación, se utilizó medio Luria-Bertani (LB) (Tabla 2.1). En ambos casos, las condiciones de crecimiento fueron 16 horas a 28°C. Para los cultivos líquidos, fueron crecidas en agitación a 28°C durante 16 horas, excepto para los ensayos de formación de biopelículas, donde el medio que se utilizó fue LB. Las cepas de *Escherichia coli*

fueron crecidas en medio LB al 1.5% de agar bacteriológico a 37°C durante 16 horas, y cultivadas en agitación cuando eran inoculadas en medio líquido.

**Tabla 2.1:** Composición de los medios de cultivo SA y LB.

Medio	Reactivos	Concentración final (g/L)	Condiciones esterilización
SA	Sacarosa	20	110° C, 15 min
	Asparagina	2	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 3H <sub>2</sub> O	1.31	
	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.5	
LB	Extracto de levadura	5	120° C, 20 min
	Triptona	10	
	NaCl	5	

Para la selección de cepas se utilizaron las siguientes concentraciones de antibiótico: rifampicina 100 µg mL<sup>-1</sup>, espectinomicina 100 µg mL<sup>-1</sup>, tetraciclina 10 µg mL<sup>-1</sup> (para *E. coli*) o 70 µg mL<sup>-1</sup> (para *P. fluorescens*) y kanamicina 25 µg mL<sup>-1</sup> (para *E. coli*) o 50 µg mL<sup>-1</sup> (para *P. fluorescens*).

Las cepas usadas en ensayos de colonización fueron marcadas con la proteína fluorescente verde o GFP (del inglés *Green Fluorescent Protein*). Los plásmidos utilizados que expresaban GFP, pDSK-GFPuv (Wang y col., 2007) y pHc60 (Cheng and Walker, 1998) fueron movilizados a *P. fluorescens* mediante conjugación triparental, haciendo uso del vector coadyuvante pRK600 (Finan y col., 1986).

### Ensayos de movilidad tipo *swimming*.

Los ensayos de movilidad tipo *swimming* se llevaron a cabo en medio SA al 0.3%, solidificado en placas de 50 mm de diámetro (cada una de éstas contenía 12 mL de medio).

Las inoculaciones se realizaron individualmente y por cuadruplicado a partir de cultivo sólido, el cual se recogía con un palillo dental estéril que posteriormente se introducía en el agar, sin llegar a contactar con el fondo de la placa. Las placas se incubaron a 28°C, efectuándose mediciones del diámetro del halo de movimiento 18 y 24 horas después del momento de inoculación de la bacteria.

### **Ensayos de formación de biopelículas en placas multipocillo.**

Para la realización de estos ensayos, se llevó cabo una modificación del protocolo de Fletcher (1977).

Los cultivos crecidos en fase exponencial en LB durante 16 horas, fueron diluidos hasta una  $DO_{600}$  de 0.04. Se añadieron 100  $\mu$ L de esta dilución en cada uno de los pocillos que conforman las placas de 96 pocillos. Los ensayos se realizaron en placas multipocillo de poliestireno y polipropileno, y en cada una se incubaron un total de 8 réplicas por cepa durante 8 horas a 28°C. Posteriormente, se añadieron 25  $\mu$ L de cristal violeta 1% en cada pocillo y se incubó durante 15 minutos. Se eliminaron los excesos de colorante con abundante agua, hasta que únicamente quedo visible el halo teñido que había quedado adherido al plástico. A continuación, se añadió a cada pocillo 200  $\mu$ L de etanol 95% para poder extraer el colorante incorporado en las células; las placas fueron selladas con *parafilm* y sometidas a agitación durante 16 horas. Tras este periodo, se midió la absorbancia del cristal violeta de cada pocillo a una longitud de onda de 590 nm, haciendo uso del lector de microplacas Spectra Fluor de Tecan (Zurich, Suiza).

### **Ensayos de formación de biopelículas en sistemas de flujo continuo.**

Mediante conjugación triparental, las cepas *P. fluorescens* F113, V35 y GSW fueron marcadas con GFP usando los plásmidos pDSK-GFPuv (Wang y col., 2007) y pHc60 (Cheng and Walker, 1998), que producen la proteína verde fluorescente.

Para estos ensayos se utilizó una modificación del método de formación de biopelículas bajo condiciones de flujo continuo de Stenberg y Tolker-Nielsen (Gjermansen y col., 2005), usando como medio de cultivo LB diluido 1:10.

Las cepas estudiadas se crecieron en medio LB durante 16 horas, y posteriormente se diluyeron hasta obtener una  $DO_{600}$  de 0.5. Aproximadamente, 300  $\mu$ L de esta dilución se inyectaron en la cámara de flujo (*flow chamber*) (BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark), la cual se encontraba conectada a una bomba peristáltica Watson Marlow 205S (Watson Marlow, Wilmington, MA, USA).

Para que las células inoculadas se adhiriesen a la cámara, durante la primera hora el flujo permaneció detenido. A continuación, se encendió la bomba para generar un flujo

constante de  $3.0 \text{ mL h}^{-1}$  que se corresponde con el número de Reynolds de 0.02 (condiciones de flujo laminar).

Las estructuras que se iban formando fueron visualizadas, tras varios tiempos de incubación que se correspondieron con 3, 6 y 24 horas, con un microscopio de láser confocal Nikon C1. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa informático Imaris (Bitplane) y mediante la aplicación COMSTAT (Heydorn y col., 2000), se determinaron una serie de parámetros característicos de una biopelícula: biomasa, grosor medio y grosor máximo.

Para realizar los test estadísticos correspondientes, se hizo uso del programa SPSS. Las diferencias significativas se analizaron mediante un test de Bonferroni de análisis de la varianza (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

### **Ensayos de colonización y colonización competitiva de la rizosfera.**

La esterilización de semillas de alfalfa (*Medicago sativa* variedad Aragón) se realizó mediante dos tratamientos, uno con etanol 70% durante 2 min., y otro con lejía diluida (1:5) durante 15 min., ambos en agitación suave. El exceso de lejía se retiró mediante sucesivos lavados con  $\text{H}_2\text{O}$  estéril. A continuación se depositaron en placas de agar al 1% (aproximadamente 40 semillas por placa) y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  en oscuridad durante 16 horas. Posteriormente se procedió a la germinación de las semillas, durante 24 horas a una temperatura de  $28^\circ\text{C}$ , también en oscuridad.

El sustrato sólido utilizado fue perlita, que se autoclavó junto con las macetas rivierra, previamente humedecido con medio FP (Fahraeus, 1957) (Tabla 2.2) utilizado como solución mineral suplementado con  $\text{KNO}_3$  8mM. Una vez esterilizado el sustrato, las semillas germinadas fueron trasplantadas a las macetas rivierra. Cada ensayo de colonización o colonización competitiva se hizo por triplicado (3 macetas con 20 plantas cada una).

Tabla 2.2: Componentes del medio FP.

Solución	Componentes	Stock (g/L)	Volumen (mL) en 1L de medio
1	CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	40	2.5
2	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	40	3
3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30	3.33
4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	45	3.33
5	Citrato férrico	2.5	2
6	<b><u>Elementos traza de Gibson</u></b>		1
	MnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	2.03	
	ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.22	1
	CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0.08	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0.08	
7	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86	1
8	KNO <sub>3</sub>	161.78	5

Transcurridos dos días, se inoculó directamente en la raíz de cada planta de alfalfa, 1 mL (en los ensayos de colonización) o 0.5 mL (en el caso de la colonización competitiva) de cultivo de las cepas de interés crecidas en medio SA durante 18 horas e igualados con anterioridad a una DO<sub>600</sub> de 0.0138 (lo que se corresponde con 10<sup>8</sup> bacterias inoculadas por planta).

Las plantas de alfalfa se regaron a lo largo de 2 semanas cada 2 días con medio FP y las condiciones de crecimiento para éstas fueron las siguientes: 16 horas de luz a 25°C y 8 horas en oscuridad a 18°C.

Tras 2 semanas desde el momento de la inoculación, se procedió a la extracción de las plantas del sustrato, y tras seccionar el último centímetro de la raíz principal (zona del ápice) y obtener el peso en gramos de todos los ápices de las plantas de una misma maceta rívera, se agitaron utilizando un vortex para recuperar las bacterias rizosféricas. Posteriormente se sembraron diluciones seriadas para realizar el recuento de colonias aproximadamente a las 48 horas.

### Microscopía de fluorescencia.

Para conseguir la visualización de la disposición de las bacterias en la raíz, se procedió a marcar *P. fluorescens* F113 y V35 con GFP, mediante un proceso de conjugación. Los plásmidos utilizados fueron pDSK-GFPuv (Wang y col., 2007) y pHG60 (Cheng y Walker, 1998).

Las plantas de alfalfa se inocularon independientemente con  $10^8$  células de cada una de las cepas marcadas con GFP. Tras 7 días de colonización de la rizosfera por parte de las bacterias inoculadas, se tomaron las raíces de alfalfa y se tiñeron con el colorante cristal violeta al 0.5% durante un minuto (para evitar en la medida de lo posible la autofluorescencia de la raíz), a las que se adicionó unas gotas del medio de montaje Vectashield (Laboratorios Vector), que facilita el mantenimiento de la fluorescencia de las muestras.

El microscopio óptico de fluorescencia utilizado (OLYMPUS BH2-RFCA) cuenta con una cámara fotográfica Leyca-MTV-3 incorporada, que permitió la captura de imágenes a través del programa informático Leica QWin.

Las imágenes de colonización de la rizosfera por parte de ambas cepas, se tomaron con los objetivos 40x y 100x, utilizando un filtro con banda de excitación de 400 a 490 nm (BP490), un espejo dicróico de 505 nm y un filtro de emisión de 530 nm (EO530).

#### **Microscopía electrónica de barrido.**

Las plantas de alfalfa se inocularon independientemente con  $10^8$  células de la cepa silvestre y del variante fenotípico V35, y se dejaron crecer durante 7 días en las condiciones descritas anteriormente.

A continuación se procedió a su recolección, se sacaron de las macetas y se procedió a cortar la raíz principal en tres zonas que se correspondían con la parte anterior, media y apical. Las secciones de la raíz se fijaron con glutaraldehído 2.5% durante dos horas y fueron lavadas posteriormente dos veces con cacodilato sódico 0.2 M (pH= 7.1) 30 minutos. A continuación, se llevó a cabo la deshidratación de las mismas utilizando para ello concentraciones crecientes de etanol (10%, 30%, 50%, 70%, 90% y 100%) durante 20 minutos.

Las porciones de raíz fijadas se sometieron a punto crítico, se montaron en las rejillas y se sombrearon con oro. Las muestras fueron visualizadas usando un microscopio electrónico de barrido XL30 de la Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido (SiDI-UAM).

## RESULTADOS

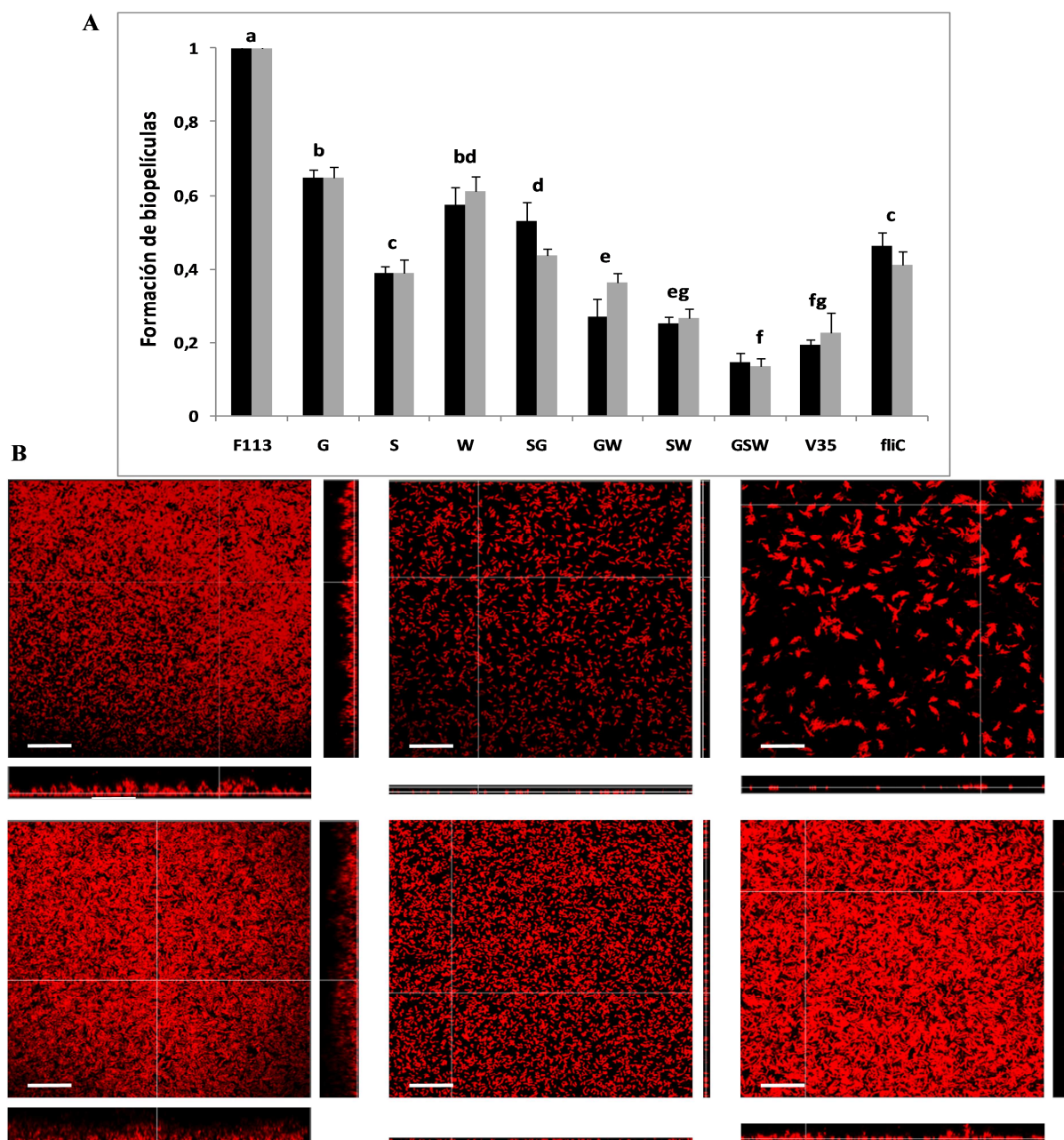
### Formación de biopelículas por mutantes hipermóviles y variantes fenotípicos.

En estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, hemos identificado varios genes que reprimen la movilidad de *P. fluorescens* F113 (Navazo y col., 2009). Además, en otras especies de *Pseudomonas*, se ha determinado que estos genes están íntimamente relacionados con procesos de formación de biopelículas. Por este motivo, quisimos averiguar si éstos ejercían un papel similar en la cepa de estudio.

Para analizar la capacidad de formar biopelículas en superficies abióticas de la cepa silvestre, así como de mutantes en los genes *gacS*, *sadB* y *wspR*, se procedió a la realización de ensayos de formación de biopelículas en dos tipos de plástico. La capacidad de formar estas estructuras se determinó por medio de la cuantificación del colorante cristal violeta.

Como se observa en la figura 2.1A, los mutantes G, S y W estaban afectados en la capacidad de formación de biopelículas, tanto en placas de poliestireno, como de propileno, ya que mostraron una importante reducción de la intensidad de tinción del cristal violeta cuando se comparaba con la cepa silvestre. También se analizó la formación de biopelículas en toda la batería de dobles y triples mutantes, observándose un claro fenotipo aditivo (Fig. 2.1A), exceptuando el caso del doble mutante *sadBgacS* (SG), el cual muestra un fenotipo intermedio. No obstante, este fenotipo aditivo que muestran los dobles mutantes, confirmado por los datos obtenidos del triple mutante *gacSsadBwspR* (GSW), sugieren que estos tres genes formarían parte de tres rutas independientes implicadas en la formación de biopelículas.

El triple mutante GSW fue prácticamente incapaz de formar biopelículas en este tipo de superficies (5 veces menor comparado con la cepa silvestre), pero muestra un fenotipo de movilidad tipo *swimming* muy similar al del variante fenotípico V35 (Fig. 2.1A), un mutante espontáneo de F113 que fue aislado de la rizosfera de alfalfa (Martínez-Granero y col., 2006). Por esta razón, decidimos analizar la capacidad de formación de biopelículas de este variante en estas mismas superficies, el cual resultó también afectado, presentando una reducción de 5 veces con respecto a la cepa silvestre (Fig. 2.1A).



**Fig. 2.1:** Capacidad de formar biopelículas en superficies abióticas por parte de *P. fluorescens* F113 y derivados. **A.** Ensayos estáticos de formación de biopelículas. Las medidas de las biopelículas se calcularon en función de la cantidad de cristal violeta absorbida por la biopelícula formada en las placas multipocillo, y determinada por la medida de absorbancia a 590 nm tras lavados en agitación con etanol 95%. A la medida de absorbancia de la cepa silvestre se le dio el valor 1. Las medias y las desviaciones típicas corresponden a 8 réplicas por placa de cada cepa en tres ensayos distintos. Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las barras negras indican los ensayos hechos en placas de poliestireno, y las barras grises a los elaborados en placas de polipropileno. **B.** Ensayos de formación de biopelículas en sistemas de flujo continuo. En la parte de arriba, y de izquierda a derecha: F113, V35 y GSW a las 6 h. En la parte de abajo, y de izquierda a derecha: F113, V35 y GSW a las 24 h. Las barras representan 50  $\mu\text{m}$ . Las estructuras tridimensionales únicamente fueron observadas en el caso de F113.



Es interesante resaltar que tanto el triple mutante GSW como el variante V35 están mucho más afectados en la formación de biopelículas que el mutante aflagelado, y por tanto inmóvil *fliC* (Capdevila y col., 2004). Esta cepa presenta interrumpido el gen que codifica la proteína estructural del flagelo, la flagelina, y por tanto presenta problemas en el acoplamiento inicial a superficies en las etapas tempranas de la formación de una biopelícula.

La capacidad de formación de biopelículas de la cepa silvestre y de las cepas afectadas GSW y V35, también se analizó mediante estudios de formación de biopelículas en un sistema de flujo continuo.

En la tabla 2.3 se resumen los parámetros característicos que definen las biopelículas obtenidos tras ensayar las tres cepas, transcurridas 3 y 6 horas. Los resultados obtenidos son muy similares a los anteriormente descritos en sistemas estáticos; la biopelícula formada tanto por el variante 35 como por el triple mutante, presentaba más de 10 veces reducida la biomasa, el grosor medio y el grosor máximo con respecto a los datos obtenidos en la cepa silvestre. Esto indica una clara afección en el proceso de formación de biopelículas en las dos cepas hipermóviles. Si analizamos los parámetros, parece que el variante 35 es el más afectado, ya que se detectan disminuciones de entre 19 y 49 veces cuando se compara con la cepa silvestre, en los estudios realizados a 6 horas.

**Tabla 2.3:** Parámetros de la formación de biopelículas.

Parámetros	F113		V35		GSW	
	3 horas	6 horas	3 horas	6 horas	3 horas	6 horas
Biomasa	4.40 ± 0.9	8.11 ± 3.20	0.35 ± 1.15*	0.30 ± 0.08*	0.09 ± 0.06*	0.34 ± 0.08*
Grosor medio (mm)	3.56 ± 1.01	8.36 ± 2.79	0.21 ± 0.12*	0.17 ± 0.06*	0.06 ± 0.05*	0.27 ± 0.06*
Grosor máximo (mm)	25.33 ± 14.97	35.79 ± 16.85	1.69 ± 0.48*	1.90 ± 0.32*	5.88 ± 1.24*	7.88 ± 1.73*

\* indica la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Las imágenes tomadas con el microscopio confocal corroboran estos datos: en F113 se detectan claramente estructuras tridimensionales tipo biopelículas tras 6 horas (Fig. 2.1B), mientras que éstas no se observan para ninguna de las otras dos cepas. En el caso del variante 35 se detecta una única capa de células continua adheridas, y en el triple mutante, las bacterias aparecen formando pequeños grupos distribuidos de forma irregular. Todas estas diferencias se agudizan cuando se procede al análisis de las imágenes tomadas a las 24 horas, ya que la estructura tridimensional formada por la cepa silvestre está más desarrollada,

mientras que en el variante 35, el más afectado, la monocapa de células no evoluciona a estadios más complejos.

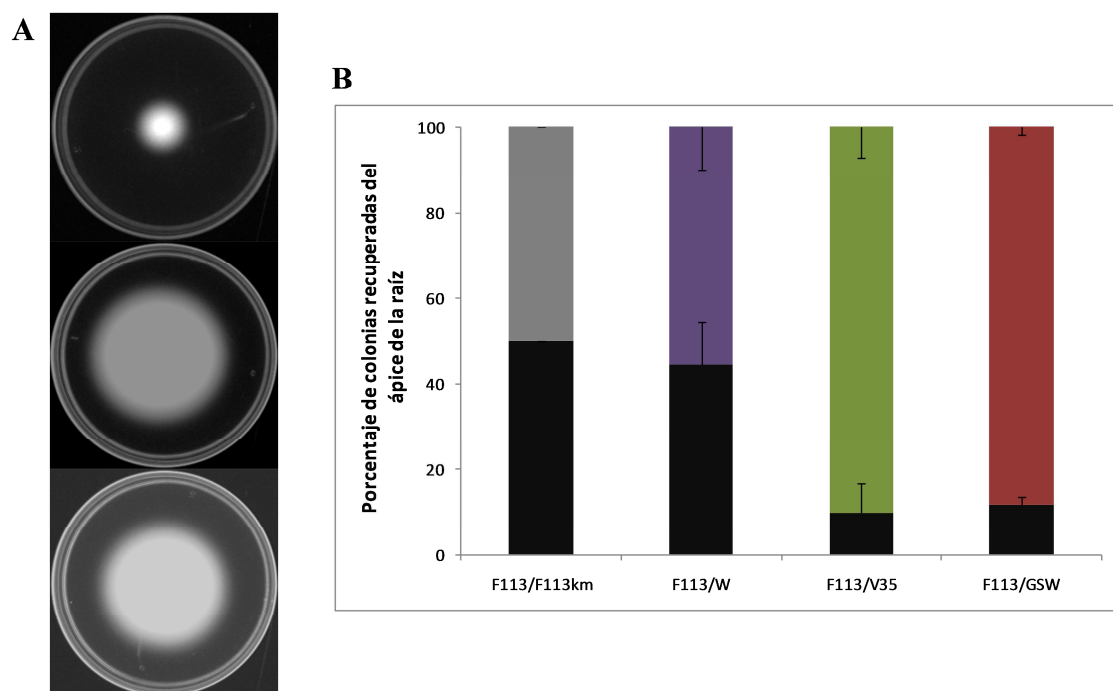
A las 24 horas, el triple mutante muestra un fenotipo intermedio con respecto a las otras dos cepas, ya que las células se agregan pero nunca llegan a formar una matriz madura.

Estos resultados muestran claramente que los tres genes analizados, *gacS*, *sadB* y *wspR* son requeridos en los procesos de formación de biopelículas en *P. fluorescens* F113, estando los mismos implicados en rutas de regulación independientes.

### **Colonización y colonización competitiva de la rizosfera.**

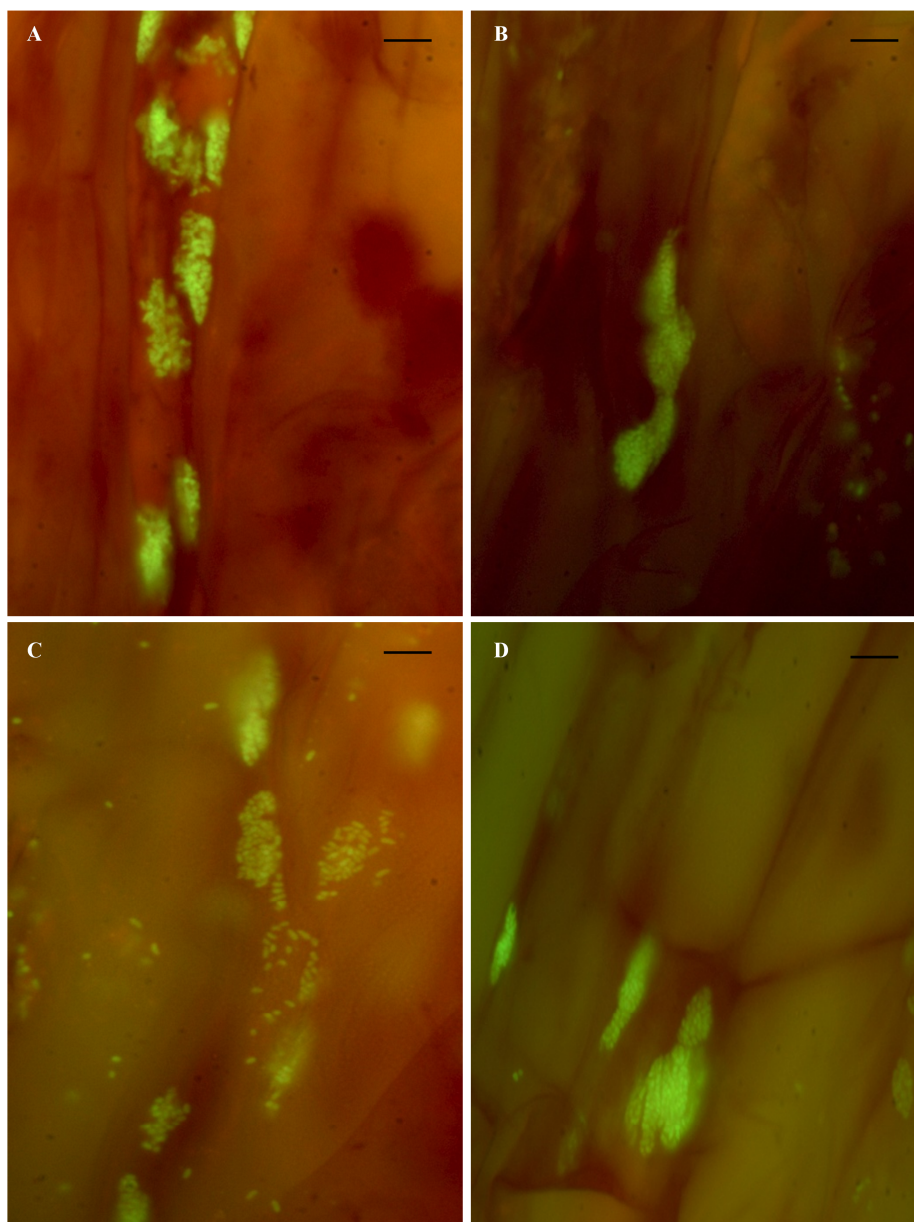
Todos los ensayos de colonización de la rizosfera realizados en el laboratorio, mostraron que ninguno de los mutantes o variantes fenotípicos estudiados estaban afectados en el proceso de colonización de la raíz, ya que no existen diferencias en el número de unidades formadoras de colonias que se recuperan del ápice de la raíz entre estas cepas y la silvestre (c.  $10^7$  ufc g<sup>-1</sup>). Tampoco se detectan diferencias cuando se procede a analizar la colonización de la totalidad de la raíz por parte de estas cepas (Sánchez-Contreras y col., 2002). Además, es importante resaltar que todos los mutantes que son desplazados por la cepa silvestre en estudios de colonización competitiva, son capaces, cuando se inoculan de forma individual, de colonizar de forma efectiva la rizosfera. Estos resultados han sido previamente publicados tanto para mutantes inmóviles (Capdevila y col., 2004), como para mutantes afectados en quimiotaxis (de Weert y col., 2002).

En la figura 2.2B se exponen los resultados obtenidos tras realizar los experimentos de colonización competitiva de 2 semanas de duración. Por una parte, no se observan diferencias en las competiciones entre la cepa silvestre y el mutante simple en *wspR*. Los mutantes G y S presentaron resultados similares a los del mutante W (datos no mostrados). Sin embargo, sí existen diferencias claras cuando las cepas que compiten son GSW o V35, ya que ambas cepas fueron capaces de desplazar a la cepa silvestre. Este resultado nos indica que estos dos mutantes hiper móviles (Fig. 2.2A) afectados en la capacidad de formar biopelículas en superficies abióticas, son más competitivos que *P. fluorescens* F113 en la colonización competitiva del ápice de la raíz, lo que claramente indica la importancia de la movilidad frente a la formación de biopelículas en este proceso.



**Fig. 2.2:** Movilidad tipo *swimming* y colonización competitiva de la rizosfera de alfalfa por F113, mutantes y variantes hipermóviles. **A.** Movilidad tipo *swimming*. Halos de movilidad producidos por F113, el mutante GSW y el variante V35 tras 18 horas desde su inoculación en la placa. La media del diámetro fue de 14, 40 y 42 mm respectivamente. **B.** Colonización competitiva de la rizosfera. La cepa silvestre se usó como cepa competidora en todos los ensayos. Las plantas se inocularon con las cepas estudiar y F113 en proporciones 1:1. Después de 2 semanas, a cada planta se le seccionó el ápice de su raíz principal, se recuperaron las bacterias colonizadoras y se sembraron en placas para realizar el recuento de colonias. Las barras negras corresponden al porcentaje de colonias de F113 recuperadas del ápice. Las barras de colores se refieren al porcentaje de colonias de las cepas ensayadas recuperadas del ápice de la raíz. Los mutates *gacS* y *sadB* presentaron resultados similares a los del mutante *wspR*.

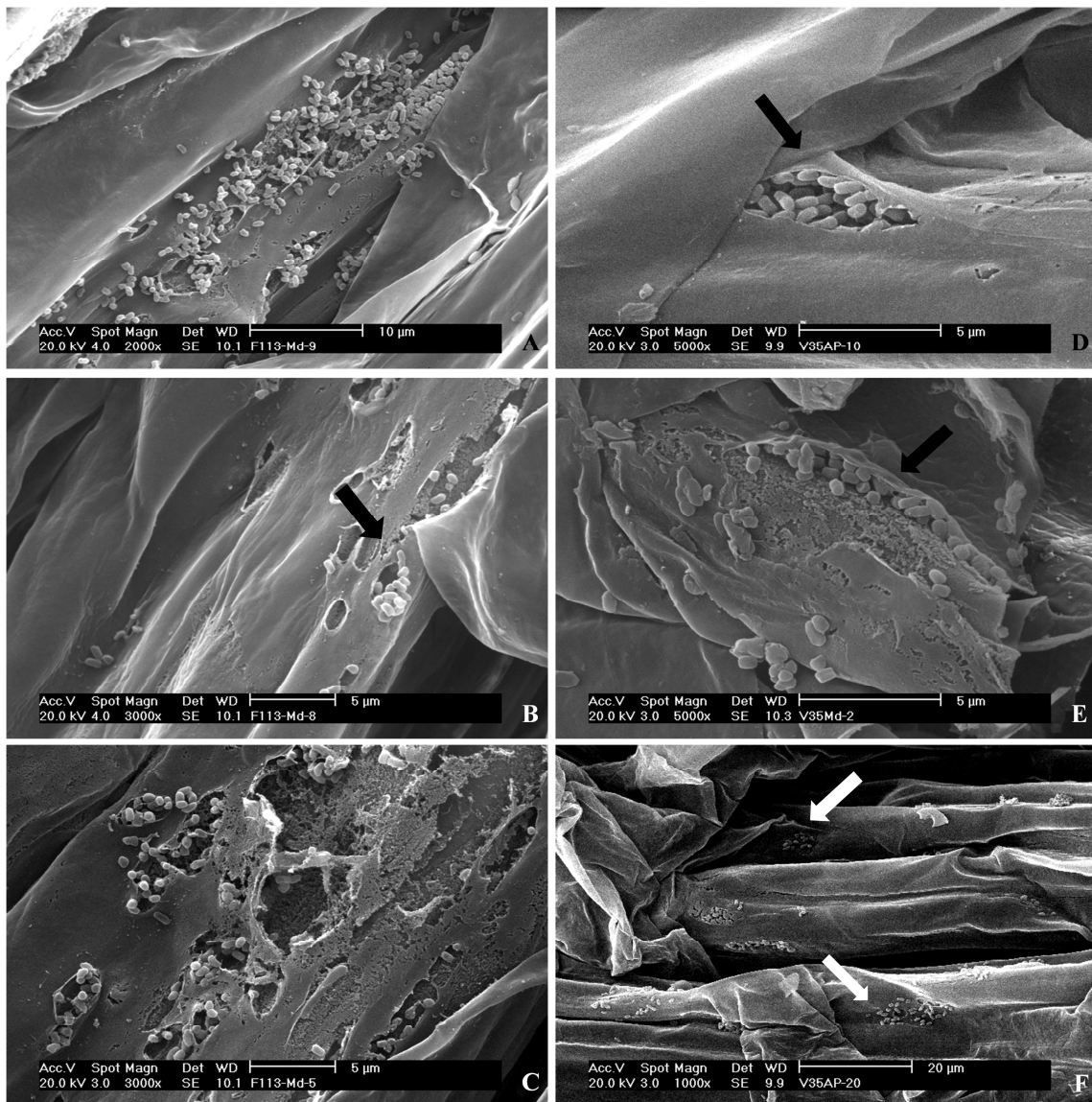
Para analizar si los patrones de colonización de la rizosfera por parte de las cepas hipermóviles y defectivas en la formación de biopelículas eran diferentes a los de la cepa silvestre, se procedió a la construcción de cepas marcadas con GFP con el objetivo de visualizar el proceso de colonización mediante microscopia de epifluorescencia. Las cepas marcadas fueron F113 y uno de los mutantes más afectados en la formación de biopelículas, V35. Esta técnica permitió observar la disposición de las células en la raíz. Como se muestra en la Figura 2.3, ambas cepas parecen estar formando el mismo tipo de estructuras en el rizoplasma y no se apreciaron diferencias entre ellas, en cuanto a forma, tamaño, patrón de colonización y número de microcolonias se refiere.



**Fig. 2.3:** Análisis de la colonización de la rizosfera de F113 y V35 marcados con GFP mediante microscopía de epifluorescencia. Las raíces se visualizaron tras una semana desde la inoculación de las bacterias. **A y B:** F113. **C y D:** V35. No se observaron diferencias en el tamaño, localización o número de microcolonias. Las barras representan 5  $\mu\text{m}$ .

Este mismo proceso se estudió con más detalle mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido, para conseguir así visualizar las microcolonias. Las imágenes de la Figura 2.4 confirman que ambas cepas colonizan de forma extensiva la superficie de la raíz y de nuevo no se pueden apreciar diferencias con respecto al patrón de colonización de la cepa silvestre y del variante 35. En ambos casos observamos que las células bacterianas se encuentran formando pequeñas colonias fuertemente empaquetadas, pero en ningún caso se detecta algún tipo de matriz extracelular sosteniendo estas microcolonias. Las matrices

extracelulares son típicas de biopelículas maduras, y son generalmente visualizadas como microfibras que conectan y envuelven a las células. En este caso, no sólo no se detectaron estas estructuras, sino que las bacterias estaban envueltas y sostenidas a la superficie de la raíz por lo que parece ser una capa de mucigel producida por la propia planta (Ching-A-Woeng y col., 1997).



**Fig. 2.4:** Análisis de la colonización de la rizosfera de alfalfa por parte de F113 y V35. **A-C:** F113. **D-F:** V35. No se detectaron diferencias en el patrón de colonización entre las dos cepas. Se puede observar el mucigel que recubre a las bacterias. Las flechas señalan zonas donde el mucigel se rompe o es desplazado y se pueden detectar las células bacterianas. Las bacterias aparecen densamente empaquetadas y no se observan fibras de exopolisacárido que unan a las células entre sí.

## DISCUSIÓN

Durante los últimos años, las *Pseudomonas* fluorescentes han sido utilizadas como microorganismos modelo en estudios de interacción planta-microorganismo, y más concretamente en lo que a la colonización de la rizosfera se refiere (Lugtenberg y Dekkers, 1999; Lugtenberg y col., 2001). Se ha descrito que estas bacterias pueden aparecer formando densas estructuras de tipo biopelículas dispuestas a lo largo del rizoplaneo, especialmente en las zonas de separación existentes entre las células epidérmicas de la raíz (Cassidy y col., 2000; Chin-A-Woeng y col., 1997; Normander y col., 1999; Ramos y col., 2000; Villaceros y col., 2003).

La formación de biopelículas es un proceso muy complejo, y su desarrollo y estructura puede ser diferente en función de las cepas y de las condiciones ambientales. En estudios previos llevados a cabo por O'Toole y Kolter (1998b), se determinó que varios mutantes de *P. fluorescens* eran incapaces de formar biopelículas debido a que estaban afectados en los primeros pasos de adhesión a superficies. Estas cepas se agruparon bajo el nombre de mutantes sad (del inglés *surface attachment defectives*), entre los cuales se encuentra el mutante *sadB*. *sadB* codifica una proteína citoplasmática que podría ser capaz de sensar di-GMPc (Kuchma y col., 2007; Merrit y col., 2007), y además, se sabía que mutantes en este gen, carecían de la capacidad de transformar un acoplamiento reversible en irreversible (Caiazza y O'Toole, 2004). En este trabajo, hemos demostrado que en *P. fluorescens* F113, el mutante hipermóvil *sadB* (Navazo y col., 2009), presenta claramente mermada la capacidad de formación de biopelículas en superficies abióticas. Sin embargo, este mutante no presenta diferencias en el proceso de colonización de la rizosfera si lo comparamos con la estirpe silvestre, ni deficiencias en el proceso de colonización competitiva.

En la misma línea, también se describió que en *P. aeruginosa*, mutantes en el gen *wspR*, el cual codifica una proteína que presenta un dominio con actividad diguanilato ciclasa, presentan una importante reducción en procesos de formación de biopelículas (Hickman y col., 2005). En el caso de *P. fluorescens* F113, el mutante W es una cepa hipermóvil (Navazo y col., 2009), y al igual que ocurre con el mutante S, está afectado en el desarrollo de biopelículas y no en los procesos de colonización o colonización competitiva de la rizosfera.

Como ya se ha comentado, un doble mutante SW muestra una importante reducción en la habilidad de formar biopelículas en los ensayos de adhesión a superficies abióticas. El hecho de que SW presente un fenotipo aditivo, sugiere que los genes *sadB* y *wspR* están

regulando este proceso por dos vías independientes. Resultados similares se obtuvieron para los procesos de *swimming* y *swarming* (Navazo y col., 2009).

El segundo mensajero di-GMPc está implicado en la regulación de los procesos de formación de biopelículas, pero además, se han propuesto otras rutas que estarían involucradas en determinar los dos estilos de vida que pueden darse en una bacteria, como por ejemplo, el sistema de dos componentes formado por las proteínas GacA y GacS. Este sistema está implicado en la regulación del metabolismo secundario de la célula. Los mecanismos de regulación son bastante complejos, ya que implican el secuestro de una serie de proteínas de unión a ARN (RsmAE) por parte de ARNs de pequeño tamaño, los cuales se expresan por acción de GacA. En ausencia de estos ARNs, las proteínas Rsm bloquean la traducción de determinados ARNs mensajeros. Se ha descrito que en *P. aeruginosa* (Davies y col., 2007; Parkins y col., 2001), en *Pseudomonas* sp. (Choi y col., 2007) y en la cepa clínica de *P. fluorescens* (Rossignol y col., 2009), mutantes en los genes *gacA* o *gacS* presentaban mermada su capacidad de formar biopelículas. En este trabajo, demostramos que en *P. fluorescens* F113, el sistema de dos componentes GacA/GacS es necesario para que tenga lugar el desarrollo de biopelículas. Además, podemos afirmar que la regulación a través de los genes *gacS*, *sadB* y *wspR* es independiente, como previamente observamos en los fenotipos obtenidos para *swimming* y *swarming* (Navazo y col., 2009), ya que el mutante GSW presenta un fenotipo aditivo en la formación de biopelículas en cualquiera de las condiciones ensayadas. Por lo tanto, podemos concluir que en F113, *gacS* no es necesario para que tenga lugar una correcta colonización o colonización competitiva de la rizosfera, lo que coincide con estudios previos realizados en *P. chlororaphis* (Schmidt-Eisenlohr y col., 2003).

Estudios anteriores llevados a cabo en el laboratorio, mostraron que cuando se sobreexpresaban las recombinasas específicas de sitio Sss y XerD durante la colonización de la rizosfera, aparecían variantes fenotípicos hipermóviles (Martínez-Granero y col., 2006). De todas estas cepas aisladas, seleccionamos el variante V35 para los ensayos de formación de biopelículas realizados en este trabajo. V35 es un variante que porta una mutación en el gen *gacS*, pero también, en otros genes que aún desconocemos y que están reprimiendo la movilidad en F113, ya que cuando se complementa la mutación sobreexpresando *gacS* en un fondo genético V35, sólo se reduce su movilidad parcialmente (Martínez-Granero y col., 2006). Tras los resultados obtenidos, se puede concluir que V35 está enormemente afectado en la capacidad de desarrollar una biopelícula en superficies abióticas pero es un excelente colonizador de la rizosfera, tanto en presencia como en ausencia de la cepa silvestre. El

variante hipermóvil, así como el triple mutante GSW fueron más competitivos que la estirpe silvestre, ya que el porcentaje de ufc recuperadas del ápice de la raíz era mucho mayor. Esto significa que la movilidad es una gran ventaja para un correcto establecimiento de las bacterias en las zonas más apicales de la raíz, y además, que en este tipo de ambiente, la capacidad de formación de biopelículas en superficies abióticas, no parece ser un proceso imprescindible para que tenga lugar una correcta colonización de la rizosfera. De hecho, parece que el conjunto de determinantes genéticos implicados en la colonización de superficies abióticas y en la colonización del rizoplaneo, son totalmente distintos. En esta línea, también se ha descrito que en el caso de *P. putida*, la colonización de la rizosfera así como la de superficies abióticas, son procesos que siguen caminos diferentes, aunque las rutas que los definen solapan parcialmente (Yousef-Coronado y col., 2008). La movilidad mediada por flagelos parece ser responsable de la distribución de esta bacteria a lo largo de la raíz, pero no debe ser la característica más importante que defina una excelente colonización de la rizosfera por parte de *P. putida*.

El conjunto de resultados expuesto en este capítulo tienen toda una serie de implicaciones de tipo biotecnológico. Cuando se procede a la selección de cepas promotoras del crecimiento vegetal, o para su uso en biocontrol, entre otros análisis, se estudia la capacidad de formar biopelículas en superficies abióticas. En este sentido, se asume que las cepas que desarrollan complejas matrices maduras, van a ser muy buenos colonizadores (Bais y col., 2004; Haggag y Timmusk, 2008; Rudrappa y col., 2008). Pero si nos basamos en nuestros resultados, esta afirmación no es necesariamente correcta, ya que cepas muy afectadas en esta característica, están presentes en el ápice de la raíz en mayor proporción que la cepa silvestre, por lo que no debe ser la formación de biopelículas la clave para colonizar estas zonas de las plantas.

Como ya se ha comentado, no se han observado diferencias en los patrones de colonización entre la cepa silvestre y el variante hipermóvil 35. Ambas cepas están formando microcolonias que se localizan sobre el rizoplaneo, preferentemente entre las células epidérmicas, hecho ya descrito anteriormente para F113 (Villacieros y col., 2003). Las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido, mostraron que las bacterias estaban dispuestas en microcolonias muy empaquetadas, y en ningún momento se observó la matriz de exopolisacárido típica de las biopelículas. Además, los grupos de células bacterianas aparecen cubiertas y sostenidas a la superficie de la raíz por una capa de mucigel sintetizada por la propia planta, lo que concuerda con lo ya estudiado por Chin-A-Woeng y colaboradores



(1997). En este estudio determinan que las microcolonias de *P. fluorescens* están sujetas al rizoplano por una capa de origen vegetal. Este patrón de colonización es similar en otras especies bacterianas aisladas de la rizosfera de tomate como *Pseudomonas mendocina*, *P. putida*, *Xantomonas oryzae* y *Acidovorax facilis*. Sin embargo, en este trabajo también se analiza la forma de colonizar de otras bacterias, como por ejemplo, cepas de *Rhizobium* o *Acinetobacter*, y se concluye, que en estos casos no se observan microcolonias. En vez de estas estructuras, las células se disponen de forma aislada, tanto a lo largo de la raíz como en los pelos radiculares, mayoritariamente en la superficie epidérmica y no entre las células epidérmicas como ocurría con las especies de *Pseudomonas*. De hecho, se ha comprobado recientemente, que cepas de *Pseudomonas* con capacidad de biocontrol pueden tener patrones distintos de colonización en una misma planta (Pliego y col., 2008). Todo esto nos da una idea de la gran variedad de estrategias que siguen las bacterias para ser capaces de colonizar la rizosfera de las plantas.

Como conclusión final, podemos decir que las biopelículas formadas por la cepa de estudio *P. fluorescens* F113 en superficies abióticas y en el rizoplano, no son la misma estructura, de hecho, son establecidas por programas genéticos diferentes. Por tanto, la capacidad de colonización de las bacterias no siempre está ligada a su habilidad para formar biopelículas en sustratos abióticos bajo condiciones de laboratorio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre de Cárcer D., Martín M., Mackova M., Macek T., Karlson U., y Rivilla R.** (2007a). The introduction of genetically modified microorganisms designed for rhizoremediation induces changes on native bacteria in the rhizosphere but not in the surrounding soil. *ISME J.* **1**: 215-223.
- Aguirre de Cárcer D., Martín M., Karlson U., y Rivilla R.** (2007b). Changes in bacterial populations and in biphenyl dioxygenase gene diversity in a polychlorinated biphenyl-polluted soil after introduction of willow trees for rhizoremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6224-6232.
- Bais H.P., Fall R., y Vivanco JM.** (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* **134**: 307-319.
- Brazil G.M., Kenefick L., Callanan M., Haro A., de Lorenzo V., Dowling D.N., y O’Gara F.** (1995). Construction of a rhizosphere pseudomonad with potential to degrade polychlorinated-biphenyls and detection of BPH gene-expression in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1946-1951.
- Caiazza N.C., y O’Toole G.A.** (2004). SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* **186**: 4476-4485.
- Capdevila S., Martínez-Granero F., Sánchez-Contreras M., Rivilla R., y Martín M.** (2004). Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology* **150**: 3889-3897.
- Cassidy M.B., Leung K.T., Lee H., y Treyors J.T.** (2000). A comparison of enumeration methods for culturable *Pseudomonas fluorescens* cells marked with green fluorescent protein. *Microbiol. Methods* **40**: 135-145.
- Cheng H.P., y Walker G.C.** (1998). Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **180**: 5183-5191.
- Chin-A-Woeng T.F.C., de Priester W., van der Bij A.J., y Lugtenberg, B. J.** (1997). Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 79-86.
- Choi K.S., Veeraraqouda Y., Cho K.M., Lee S.O., Jo G.R., Cho K., y Lee K.** (2007). Effect of *gacS* and *gacA* mutations on colony architecture, surface motility, biofilm formation and chemical toxicity in *Pseudomonas* sp. KL 28. *J. Microbiol.* **45**: 492-498.
- Davies J.A., Harrison J.J., Marques L.L., Foglia G.R., Stremick C.A., Storey D.G., y col.** (2007). The GacS sensor kinase controls phenotypic reversion of small colony variants isolated from biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**: 32-46.
- Dekkers L. C., Mulders I.H.M., Phoelich C.C., Chin-A-Woeng T.F.C., Wijfjes A.H.M., y Lugtenberg B.J.J.** (2000). The *sss* colonization gene of the tomato-*Fusarium oxysporum* F. sp *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria. *Mol. Plant-Microbe. Interact.* **13**: 1177-1183.

- de Weert S., Vermeiren H., Mulders I.H.M., Kuiper I., Hendrickx N., Bloemberg G.V., y col.** (2002). Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**: 1173-1180.
- Fahraeus, G.** (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by simple glass technique. *J Genet Microbiol* **16**: 374-381.
- Finan T.M., Kunkel B., de Vos G.F., y Signer E.R.** (1986). Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* **167**: 66-72.
- Gjermansen M., Ragas P., Sternberg C., Molin S., y Tolker-Nielsen T.** (2005). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ. Microbiol.* **7**: 894-906.
- Fletcher A.** (1977). The effects of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Can. J. Microbiol.* **23**: 1-6.
- Haas D., y Defago G.** (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 307-319.
- Haggag W.M., y Timmusk S.** (2008). Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *J. Appl. Microbiol.* **104**: 961-969.
- Hengge R.** (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 263-273.
- Heydorn A., Nielsen A.T., Hentzer M., Sternberg C., Givskov M., Ersbøll B.K., y Molin S.** (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* **146**: 2395-2407.
- Hickman J.W., Tifrea D.F., y Harwood C.S.** (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 14422-14427.
- Hiltner L.** (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und der Brache. *Arb DGL* **98**: 59-78.
- Kuchma S.L., Brothers K.M., Merritt J.H., Liberati N.T., Ausubel F.M., y O'Toole G.A.** (2007). BifA a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* **189**: 8165-78
- Lazazzera, B.** (2005). Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 222-227.
- Lugtenberg B.J., y Dekkers L.C.** (1999). What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environ. Microbiol.* **1**: 9-13.
- Lugtenberg B.J., Dekkers L.C., y Blomberg G.V.** (2001). Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **39**: 461-490.
- Martínez-Granero F., Rivilla R., y Martín M.** (2006). Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3429-3434.
- Merritt J.H., Brothers K.M., Kuchma S.L., y O'Toole G.A.** (2007). SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J. Bacteriol.* **189**: 8154-8164.

- Naseby D.C., y Lynch J.M.** (1998). Impact of wild-type and genetically modified *Pseudomonas fluorescens* on soil enzyme activities and microbial population structure in the rhizosphere of pea. *Mol Ecol* **7**: 617-625.
- Navazo A., Barahona E., Redondo-Nieto M., Martínez-Granero F., Rivilla R., y Martín M.** (2009). Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microbial Biotechnology* **2**: 489-498.
- Normander B., Hendriksen N.B., y Nybroe O.** (1999). Green fluorescent protein-marked *Pseudomonas fluorescens*: localization, viability, and activity in the natural barley rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4646-4651.
- O'Toole G.A., y Kolter R.** (1998a). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol* **30**: 295-304.
- O'Toole G.A., y Kolter R.** (1998b). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**: 449-461.
- Parkins M.D., Ceri H., y Storey D.G.** (2001). *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **40**: 1215-1226.
- Pliego C., de Weert S., Lamers G., de Vicente A., Bloemberg G., Cazorla F.M., y Ramos C.** (2008). Two similar enhanced root-colonizing *Pseudomonas* strains differ largely in their colonization strategies of avocado roots and *Rosellinia necatrix* hyphae. *Environ Microbiol.* **10**: 3295- 3304.
- Ramos C., Molina L., Mølbak L., Ramos J.L., y Molin S.** (2000). A bioluminescent derivative of *Pseudomonas putida* KT2440 for deliberate release into the environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**: 91-102.
- Rossignol G., Sperandio D., Guerrillon J., Duclairoir Poc C., Soum-Souter E., Orange N., y col.** (2009). Phenotypic variation in the *Pseudomonas fluorescens* clinical strain MFN1032. *Res. Microbiol.* **160**: 337-344.
- Rudrappa T., Biedrzycki M.L., y Bais H. P.** (2008). Causes and consequences of plant associated biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **64**: 153-166.
- Sánchez- Contreras M., Martín M., Villaceros M., O'Gara F., Bonilla I., y Rivilla R.** (2002) Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* **184**: 1587-1596.
- Scher F.M., y Baker R.** (1982). Effects of *Pseudomonas putida* and a symthetic iron chelator on induction of soil supressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytoph* **72**: 1567-1573.
- Schmidt-Eisenlhr H., Gast A., y Baron C.** (2003). Inactivation of *gacS* does not affect the competitiveness of *Pseudomonas chlororaphis* in the *Arabidopsis thaliana* rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1817-1826.
- Shanahan P., Borro A., O'Gara F., y Glennon, J. D.** (1992). Isolation, trace enrichment and liquid-chromatographic analysis of diacetylphloroglucinol in culture and soil samples using UV and amperometric detection. *J. Chromat.* **606**: 171-177.
- Villaceros M., Power B., Sánchez-Contreras M., Lloret J., Oruezábal R.I., Martín M., y col.** (2003) Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. *Plant Soil* **251**: 47-54.

- Villacieros M., Whelan C., Mackova M., Molgaard J., Sánchez-Contreras M., Lloret J., y col.** (2005). Polychlorinated biphenyl rhizoremediation by *Pseudomonas fluorescens* F113 derivatives, using a *Sinorhizobium meliloti* nod system to drive *bph* gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2687-2694.
- Wang K., Kang L., Anand A., Lazarowits G., y Mysore K.S.** (2007). Monitoring in plant bacterial infection at both cellular and whole-plant levels using the green fluorescent protein variant GFPuv. *New Phytol.* **174**: 212-223.
- Yee D.C., Maynard J.A., y Wood T.K.** (1998). Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene ortho-monooxygenase constitutively. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 112-118
- Yousef-Coronado F., Travieso M.L., y Espinosa-Urgel M.** (2008). Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **288**: 118-124.





### ***CAPÍTULO 3***

---

Un mutante de *Pseudomonas fluorescens* F113 más competitivo, presenta mejorada su capacidad de biocontrol de hongos patógenos de raíz.





## RESUMEN

La movilidad es uno de los factores más importantes para que tenga lugar una colonización eficiente de la rizosfera por parte de *Pseudomonas fluorescens* F113. En esta bacteria, la movilidad es una característica multigénica que está reprimida por al menos tres rutas de señalización independientes, que incluyen: el sistema de regulación post-transcripcional Gac, la ruta Wsp, similar a los sistemas de quimiotaxis, y la ruta en la que interviene SadB. En este trabajo mostramos, que el gen *kinB*, que codifica una proteína que forma parte de un sistema de dos componentes implicado en la síntesis de alginato, participa también en la represión de la movilidad tipo *swimming*. KinB a su vez se encuentra regulado por el sistema GacAS. Los mutantes Gac están afectados en la producción de metabolitos secundarios y por tanto, tienen mermada su capacidad de biocontrol. Pero tanto el mutante en el gen *kinB*, como un triple mutante afectado en los genes *kinB*, *sadB* y *wspR* (KSW), poseen intacto el metabolismo secundario y muy incrementada su capacidad de movimiento. KSW, al igual que los variantes de fase seleccionados en la rizosfera de las plantas, tienen aumentada su competitividad respecto a la estirpe silvestre. En el presente trabajo, hemos comparado la capacidad de biocontrol de KSW con F113 y con un variante fenotípico (V35) hipermóvil y más competitivo, pero que presenta alteraciones en el metabolismo secundario, ya que es portador de mutaciones *gac*. Los experimentos de biocontrol en los patosistemas *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FOL)/*Lycopersicum esculentum* (tomate) y *Phytophthora cactorum* (Pc)/*Fragaria vesca* (fresa) muestran que las tres cepas ensayadas poseen capacidad de biocontrol; siendo considerablemente menor en el V35, indicando que la producción de metabolitos secundarios parece ser un factor importante en el proceso de biocontrol. El triple mutante KSW presentó aumentada la actividad de biocontrol comparada con la de la cepa silvestre, lo que significa, que un incremento en la habilidad de colonizar competitivamente la rizosfera da lugar a un aumento de la capacidad de biocontrol, y que por tanto, es factible el diseño racional de cepas mejoradas mediante mutaciones dirigidas.

## INTRODUCCIÓN

*Pseudomonas fluorescens* F113 fue aislada de la rizosfera de remolacha (Shanahan y col., 1992) y es capaz de suprimir la enfermedad denominada *take-all* (podredumbre en las raíces de las plantas), generada por el hongo oomicete *Pythium ultimum* (Fenton y col., 1992). Esta cepa presenta la habilidad de colonizar eficientemente la rizosfera de una gran cantidad de plantas (Aguirre de Cárcer y col., 2007a; Dekkers y col., 2000; Naseby y Lynch 1999; Sánchez-Contreras y col., 2002), por lo que ha sido un organismo modelo en estudios del proceso de colonización de la rizosfera (Barahona y col., 2010; Martínez-Granero y col., 2006; Sánchez-Contreras y col., 2002). Además, ha sido objeto de modificaciones genéticas que le permiten degradar contaminantes del suelo de tipo bifenilos policlorados o PCBs (del inglés *Polychlorinated Biphenyls*) (Aguirre de Cárcer y col., 2007b; Brazil y col., 1995; Villaceros y col., 2005). La capacidad de biocontrol de esta bacteria está íntimamente relacionada con la producción de toda una serie de metabolitos secundarios, entre los que se incluyen sideróforos, 2,4-Diacetilfloroglucinol (DAPG), ácido cianhídrico y proteasas extracelulares (Aarons y col., 2000; Shanahan y col., 1992). La producción de todos estos metabolitos está regulada post-transcripcionalmente por el sistema de dos componentes GacAS (Aarons y col., 2000).

El sistema de dos componentes GacAS, junto con la proteína SadB y el sistema Wsp, regulan independiente la movilidad tipo *swimming* en *P. fluorescens* F113 (Navazo y col., 2009). De hecho, las cepas afectadas en estos genes presentan incrementada la movilidad. En F113, los genes *sadB* y *wspR* muestran un 84% y 83% de identidad, respectivamente, con sus ortólogos en *P. aeruginosa*, y sus secuencias están altamente conservadas con la de sus ortólogos correspondientes de todas la cepas de *P. fluorescens* secuenciadas. SadB y WspR regulan la movilidad tipo *swimming* posiblemente a través del segundo mensajero di-GMPc, puesto que WspR posee actividad diguanilato ciclase (Hickman y col., 2005) y SadB contiene un dominio HD modificado típico de proteínas con actividad fosfodiesterasa (Caiazza y O'Toole, 2004). En estudios previos, hemos mostrado como un triple mutante *gacSsadBwspR* (GSW) es hipermóvil (Navazo y col., 2009) y más competitivo que la cepa silvestre, ya que es capaz de desplazarla en estudios de colonización competitiva de la rizosfera (Barahona y col., 2010). También hemos descrito variantes fenotípicos que han sido seleccionados por el ambiente rizosférico (Martínez-Granero y col., 2006; Sánchez-Contreras y col., 2002). Estos variantes, además de ser mutantes en el sistema *gac*, presentan otras mutaciones adicionales aún no identificadas que les confieren una mayor movilidad, lo que conlleva una capacidad competitiva mejorada (Martínez-Granero y col., 2006).

La capacidad de colonizar la rizosfera se ha considerado un factor muy importante para que una bacteria sea un buen agente de biocontrol. Kamilova y col. (2007) mostraron como una cepa de *Collimonas fungivorans*, que coloniza la rizosfera de tomate, fue capaz de controlar al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* ocupando los mismos lugares que éste en la raíz y compitiendo por los nutrientes existentes. En la misma línea, Pliego y col. (2008) describieron que dos cepas de *Pseudomonas* colonizadoras de la rizosfera presentan capacidades diferentes de biocontrolar a *Rosellinia necatrix* en las raíces de aguacate. La mayor habilidad de biocontrol de una de estas cepas fue atribuida a su estrategia de colonización, considerándose que el sitio ocupado por la bacteria es más importante que los niveles de colonización.

En el caso de los derivados de *P. fluorescens* F113, el fenotipo de hipercompetitividad de GSW y V35 estaba ligado a su hipermovilidad. Además, ambas cepas no presentan diferencias entre sí, ni en los niveles, ni en los patrones de colonización de la rizosfera (Barahona y col., 2010). No obstante, estas cepas altamente competitivas no son adecuadas para ser utilizadas como agentes de biocontrol, debido a que portan mutaciones en el sistema de dos componentes GacAS, lo que conlleva una incapacidad para sintetizar metabolitos secundarios.

En este trabajo describimos que una mutación en el gen *kinB*, que codifica una proteína sensora que forma parte de un sistema de dos componentes (KinB/AlgB), conduce a un fenotipo hipermóvil. Aunque este gen parece actuar en la misma ruta que el sistema GacAS, lo hace por debajo de los genes *gacA* y *gacS*, por tanto presenta un fenotipo similar al de la cepa silvestre en cuanto a metabolismo secundario se refiere. El objetivo de este trabajo es estudiar si el incremento en la capacidad de colonizar competitivamente la rizosfera va unido a un mejor funcionamiento como agente de biocontrol.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Microorganismos, plásmidos y condiciones de crecimiento.**

Las cepas y plásmidos utilizados en todos los ensayos de este trabajo se exponen en la Tabla 3.1.

Las cepas de *Pseudomonas* se crecieron en medio SA (Sacarosa-Asparragina) (Scher y Baker, 1982) suplementado con  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Tabla 2.1); en agitación durante 16 horas a 28°C. Para los cultivos sólidos se añadió agar purificado al 1.5% (Pronadisa, España). Para los

experimentos de biocontrol, al igual que para los procesos de conjugación, las cepas de *Pseudomonas* se crecieron en medio Luria-Bertani (LB) (Tabla 2.1) durante 16 horas a 28°C.

Las cepas de *Escherichia coli* fueron crecidas en medio LB al 1.5% a 37°C durante 16 horas, y cultivadas en agitación cuando eran inoculadas en medio líquido.

**Tabla 3.1:** Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.

	Características	Referencia
Cepas bacterianas		
DH5α	Cepa de clonaje de <i>E. coli</i>	Gibco-BRL
F113rif	Cepa sivestre de <i>P. fluorescens</i> F113 Rif <sup>R</sup>	(Shanahan y col., 1992)
F113gacS	F113rif gacS <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	(Martínez-Granero y col., 2006)
F113sadB	F113rif sadB <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	(Navazo y col., 2009)
F113kinB	F113rif kinB <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Este trabajo
F113wspR	F113rif wspR <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Spc <sup>R</sup>	(Navazo y col., 2009)
F113algB	F113rif algB <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Este trabajo
F113gacS-kinB	F113rif kinB <sup>-</sup> gacS <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup>	Este trabajo
F113kinB-sadB	F113rif kinB <sup>-</sup> sadB <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Este trabajo
F113kinB-wspR	F113rif kinB <sup>-</sup> wspR <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Spc <sup>R</sup>	Este trabajo
F113gacS-sadB-wspR	F113rif sadB <sup>-</sup> wspR <sup>-</sup> gacS <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Spc <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup>	(Navazo y col., 2009)
F113kinB-sadB-wspR	F113rif sadB <sup>-</sup> wspR <sup>-</sup> kinB <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Spc <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup>	Este trabajo
F113kinB(pBG1708)	F113rif kinB <sup>-</sup> pLFAR3kinB Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
F113v35	Variante fenotípico hipermóvil	(Martínez-Granero y col., 2005)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Cepa aislada de tomate, causa podredumbre del pie y cuello en tomate	IPO-DLO, Wageningen, Holanda
<i>Phytophthora cactorum</i>		
CH971	Causa daños en tronco de aguacate,	IFAPA, Málaga, España.
CH972	patógeno de muchas plantas	
CH1020		
CH1021		
Plásmidos		
pGEM®T-easy vector	Vector de clonaje Amp <sup>R</sup>	Promega
pK18mobsacB	Vector suicida derivado de pUC18 lacZ mob site sacB, Km <sup>R</sup>	(Schäfer y col., 1994)
pG18mob2	Vector suicida derivado de pUC18 lacZ mob site, Gn <sup>R</sup>	(Kirchner y Tauch, 2003)
pBG1708	Derivado de pLFAR3 conteniendo los genes kinB y algB	Este trabajo
pRK2013	Plásmido coadyuvante Km <sup>R</sup>	(Figurski y Helinski, 1979)
pRK600	Plásmido coadyuvante Cm <sup>R</sup>	(Finan y col., 1986)

Para la selección de cepas se utilizaron las siguientes concentraciones de antibiótico: rifampicina  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , espectinomicina  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , tetraciclina  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (para *E. coli*) o  $70 \mu\text{g mL}^{-1}$  (para *P. fluorescens*), kanamicina  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  (para *E. coli*) o  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  (para *P. fluorescens*) y gentamicina  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (para *E. coli*) o  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$  (para *P. fluorescens*).

El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* fue cultivado en medio Agar Patata Dextrosa (PDA) y crecido en medio líquido Czapek-Dox (Thom y Raper, 1945) a  $25^{\circ}\text{C}$ . Cuando fue necesario, el medio fue solidificado con agar al 1.8%. El oomicete *Phytophthora cactorum* se creció en medio OMA durante 10 días a  $25^{\circ}\text{C}$ . Después de este periodo, se cultivó en medio PDA, también a  $25^{\circ}\text{C}$  a lo largo de 11 días.

### Ensayos fisiológicos y enzimáticos.

Los ensayos de movimiento tipo *swimming* se llevaron a cabo en medio SA al 0.3%, solidificado en placas de 50 mm de diámetro (cada una de éstas contenía 12 mL de medio). Las inoculaciones se realizaron individualmente y por cuadruplicado a partir de cultivo sólido, el cual se recogía con un palillo dental estéril que posteriormente se introducía en el agar, sin llegar a contactar con el fondo de la placa. Las placas se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$ , efectuándose mediciones del diámetro del halo de movimiento 18 y 24 horas después del momento de inoculación de la bacteria.

Para determinar la presencia o ausencia de producción de exoproteasa, las cepas se sembraron en placas que contenían un medio con leche desnatada (Martínez-Granero y col., 2005) y se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$ . Pasadas 48 horas se observó si existía un halo que se corresponde con la degradación de las proteínas de la leche alrededor de la zona de crecimiento de las cepas.

La alteración en la síntesis de pioverdina se detectó tras sembrar las cepas en placas con medio LB sólido (medio rico en hierro) a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Las placas se expusieron a la luz ultravioleta en un transiluminador (Bio-Rad) y se detectaron aquellas cepas que sobreproducían este sideróforo.

Para la detección de la producción de ácido cianhídrico (HCN) se utilizó el método descrito por Castric y Castric (1983). Las tiras de papel de cromatografía Whatman 3MM se impregnaron con una solución de cloroformo que contenía etil acetoacetato de cobre (II) (5mg/mL) y 4,4'-metilenebis-(N,N-dimetilalanina) (5mg/mL), y fueron secadas en oscuridad. Posteriormente se colocaron en la tapa de las placas petri que contenían las cepas a ensayar

previamente crecidas en SA. Las placas se incubaron durante 40 horas a 28°C en oscuridad. El cambio de coloración del papel de blanco a azul indicó que la reacción de HCN fue positiva.

### **Construcción y análisis de mutantes.**

Para la reconstrucción del mutante *kinB*, se procedió al diseño de oligonucleótidos (KinB-F2, 5'-TCGACGAGGGCATCGCC-3' y KinB-R2, 5'- AGCAGTTCATCGACGTTGG-3') que permitieron la amplificación de una región interna del gen *kinB*, de aproximadamente 500 pares de bases. Este fragmento fue clonado en el vector de clonaje pGEM®T-easy vector (Tabla 3.1) para generar dianas *EcoRI*. Posteriormente se ligó en los vectores suicidas pK18*mobsacB* (Schäfer y col., 1994) y pG18*mob2* (Kirchner y Tauch, 2003) (Tabla 3.1). Estas construcciones fueron introducidas en F113 o derivados de F113 por medio de conjugaciones triparentales usando pRK2013 (Figurski y Helinski, 1979) y pRK600 (Finan y col., 1986) como plásmidos coadyuvantes (Tabla 3.1). Los mutantes generados por procesos de recombinación homóloga se seleccionaron por medio de los antibióticos correspondientes. Mediante esta misma técnica se procedió a la construcción del resto de dobles y triples mutantes, y todas estas cepas fueron analizadas mediante *Southern-Blot* y PCR.

Además, se construyó un mutante *algB*, para lo cual se diseñaron oligonucleótidos (AlgB-F1, 5'- CGGCTAGAGCAGCTCCTT -3' y AlgB-R1 5'- GCGGGCAGATAATGCTGGC -3') que permitieron amplificar una región interna del gen, de aproximadamente 400 pares de bases. Una vez amplificado este fragmento, se procedió del mismo modo descrito anteriormente para la reconstrucción del mutante *kinB*.

### **Ensayos de colonización competitiva de la rizosfera.**

La esterilización de semillas de alfalfa (*Medicago sativa* variedad Resis) se realizó mediante dos tratamientos, uno con etanol 70% durante 2 min. y otro con lejía diluida (1:5) durante 15 min., ambos en agitación suave. El exceso de lejía se retiró mediante sucesivos lavados con H<sub>2</sub>O estéril. A continuación, se depositaron las semillas en placas de agar al 1% (aproximadamente 40 semillas por placa) y se incubaron a 4°C en oscuridad durante 16 horas. Posteriormente se procedió a la germinación de las semillas, durante 24 horas a una temperatura de 28°C, también en oscuridad.

El sustrato sólido utilizado fue perlita. Se autoclavaron 3.5L de perlita en cada una de las macetas riviera, previamente humedecida con medio FP (Fahraeus, 1957) (Tabla 2.2) como

solución mineral suplementado con  $\text{KNO}_3$  8 mM. Una vez esterilizado el sustrato, las semillas germinadas fueron trasplantadas a las macetas ríveria. Cada ensayo se hizo por triplicado (3 macetas con 20 plantas cada una).

Transcurridos dos días, se inoculó directamente en la base de la raíz de cada planta de alfalfa, 1 mL de una mezcla 1:1 de las cepas de interés crecidas en medio SA durante 18 horas e igualadas con anterioridad a una  $\text{DO}_{600}$  de 0.0138 (lo que se corresponde con  $10^8$  bacterias inoculadas por planta,  $10^8 \text{ células/mL} = 0.0138 \text{ DO}_{600}$ ).

Las plantas de alfalfa se regaron a lo largo de 2 semanas cada 2 días con medio FP y las condiciones de crecimiento para éstas fueron las siguientes: 16 horas de luz ( $100 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}$ ) a  $25^\circ\text{C}$  y 8 horas en oscuridad a  $18^\circ\text{C}$ , con una humedad del 60-70%.

Tras 2 semanas desde el momento de la inoculación, se procedió a la extracción de las plantas del sustrato, y tras seccionar el último centímetro de la raíz principal (zona del ápice) y obtener el peso en gramos de todos los ápices de las plantas de una misma maceta ríveria, se recuperaron las bacterias mediante agitación por vortex. Se cultivaron en placas con antibióticos las diluciones seriadas, realizándose el recuento de colonias aproximadamente a las 48 horas.

### **Ensayos de biocontrol.**

#### ***Sistema Fusarium oxysporum sp. Lycopersici (FOL)/Lycopersicum esculentum (tomate).***

Las semillas de tomate que se utilizaron para el ensayo eran de la variedad Juliana. Éstas fueron previamente esterilizadas durante 2 minutos con etanol 70% y 15 minutos con lejía previamente diluida (1:5). Para eliminar el exceso de lejía, se lavaron varias veces con agua destilada estéril.

Una vez desinfectadas y lavadas, las semillas se inocularon durante 15 min con el cultivo equivalente a  $7 \times 10^5$  ufc/semilla de cada una de las cepas a ensayar: F113, V35 y KSW. Posteriormente, las semillas ya inoculadas, se depositaron en macetas que contenían una mezcla de perlita estéril y sustrato comercial con base de turba (50:50). En los tratamientos que requerían de la presencia del hongo, el sustrato se mezcló con una suspensión del patógeno de  $3 \times 10^6$  esporas/L.

Para cada tratamiento y cada control, incluyendo el control sin microorganismos, se utilizaron 50 plantas que se mantuvieron durante 3 semanas bajo condiciones controladas (18

horas de luz a 24°C y 8 horas de oscuridad a 16°C) y suplementadas con agua destilada cada dos días.

Tras 21 días, se detectaron tanto plantas muertas como sintomáticas y se procedió a la recolección de las mismas. Las plantas se extrajeron de las macetas para así cortar las raíces en fragmentos de aproximadamente 0.5 cm de longitud. Éstos fueron esterilizados, posteriormente sembrados en placas que contenían medio PDA-ácido (10 placas por tratamiento), y por último, incubados a 25°C durante dos días para poder determinar el porcentaje de recuperación del patógeno.

Una vez realizados los recuentos de FOL en los segmentos de las raíces, todos los datos fueron comparados usando el programa estadístico SPSS. Utilizando el test de Bonferroni para el análisis de la varianza, se calcularon las diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

#### ***Sistema Phytophthora cactorum (Pc)/Fragaria vesca (fresa).***

Las plantas de fresa (variedad Camarosa) clonadas por micropropagación, se crecieron en botes estériles y posteriormente se trasplantaron a macetas que contenían 200 mL de una mezcla estéril de suelo: arena: perlita (11:4:2). Se regaron con agua estéril dos veces por semana. La aclimatación de las plantas de fresa se realizó durante 4 semanas y se dispusieron un total de 20 por tratamiento.

Una vez superado el periodo de aclimatación, se extrajeron las plantas de fresa de los semilleros y las raíces se esterilizaron con lejía diluida (0.06%). Posteriormente, se procedió a la bacterización de las raíces. Para esto, la raíz se sumergió en bandejas que contenían los cultivos de las cepas de *Pseudomonas*, previamente crecidos en medio LB ( $DO_{600}=0.9$ ) y resuspendidos en tampón fosfato (pH 7.2, 0.1 M), durante 20 minutos. A continuación, se plantaron en macetas. Después de dos días, se procedió a la inoculación del hongo. Para obtener las zoosporas de *Phytophthora cactorum*, se le sometió a un choque térmico: 2 horas a 10°C, y posteriormente, 1 hora a temperatura ambiente para conseguir así la liberación de las esporas de los esporangios. Una vez obtenida la suspensión del patógeno, las plantas de fresa se inocularon por riego ( $5 \times 10^4$  zoosporas/L) con una suspensión que consistió en una mezcla 1:1:1:1 de las cuatro cepas de Pc utilizadas (Tabla 3.1).

Después de 15 días desde la inoculación del patógeno, se determinaron plantas muertas y sintomáticas, y se procedió a su recolección. Se separaron tanto las raíces como la corona de la parte aérea. Las raíces se cortaron en segmentos de aproximadamente 0.5 cm de



longitud que se esterilizaron. Posteriormente, estos trozos se sembraron en dos tipos de medios: PDA-ácido y P<sub>5</sub>ARP (medio específico de Pc) (Erwin y Ribeiro, 1996), y se incubaron durante dos días a 25°C para poder determinar el porcentaje de recuperación del patógeno.

Una vez realizados los recuentos de la ausencia o presencia de Pc en los segmentos de las raíces, todos los datos fueron comparados usando el programa estadístico SPSS. Utilizando el test de Bonferroni para el análisis de la varianza, se calcularon las diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

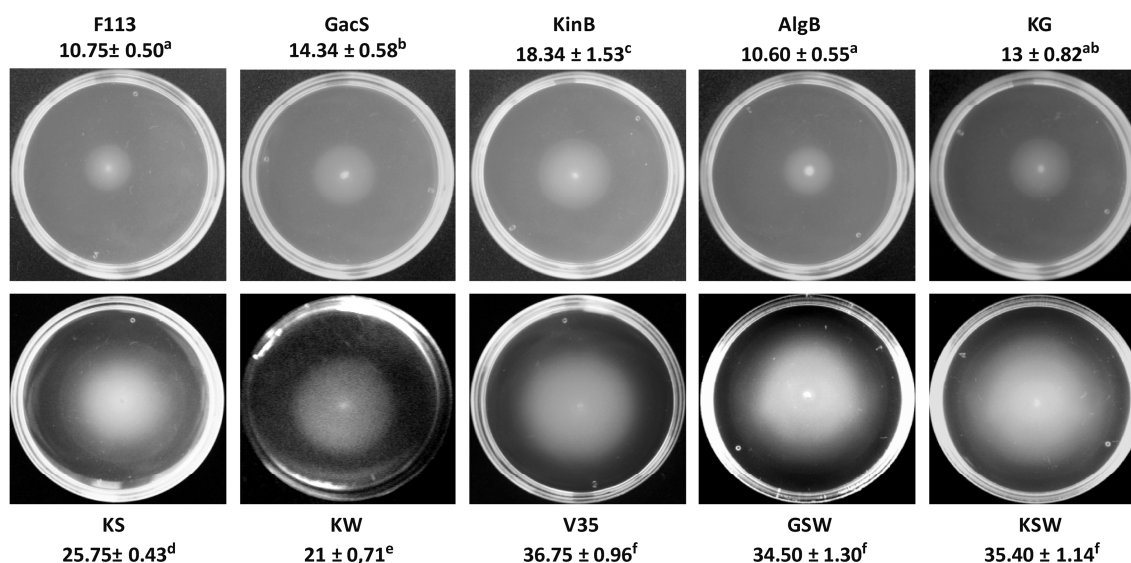
### Análisis fenotípico de los mutantes *kinB*.

Para conseguir identificar genes que actuaban reprimiendo la movilidad de *P. fluorescens* F113, se procedió a la construcción de una librería de mutantes, mediante mutagénesis al azar por transposición. Tras estos estudios, se consiguieron aislar una serie de cepas más móviles que la silvestre, y una vez realizados los análisis pertinentes, se identificaron los genes interrumpidos por la inserción del transposón (Navazo y col., 2009). El mutante que presentaba la inserción del transposón en *kinB* fue más móvil que la cepa silvestre (Navazo y col., 2009), y el gen mostró un 86% de identidad de secuencia con el gen *kinB* de *P. fluorescens*. Al igual que en PfO-1 y otras *Pseudomonas*, este gen es el último de un operón bicistrónico precedido por el gen *algB* (86% de identidad de secuencia con el ortólogo en PfO-1). Para corroborar que el fenotipo hipermóvil era debido a la inserción del transposón, se procedió a la reconstrucción del mutante por inserción mediante un proceso de recombinación homóloga. Para ello, se clonó un fragmento interno del gen *kinB* en un vector suicida, se introdujo por conjugación en la cepa silvestre y se analizaron por *Southern-blot* las colonias obtenidas para así asegurarnos de que el gen estaba interrumpido. Este nuevo mutante fue usado para el resto de análisis llevados a cabo en este trabajo. De la misma manera, es decir, mediante mutagénesis por inserción, se construyó un mutante *algB*, el cual codifica el regulador de respuesta.

Como se puede observar en la Figura 3.1, el mutante *kinB* mostraba un incremento de la movilidad tipo *swimming* con respecto a la cepa silvestre, mientras que un mutante *algB* presentaba la misma movilidad cuando lo comparamos con F113. Esto nos indica claramente que el fenotipo de hipermovilidad que presentaba el mutante *kinB*, es únicamente debido a la pérdida de funcionalidad de este gen. Los posibles efectos polares de la mutación se

descartaron debido a que la alteración en el primer gen del operón, *algB*, no implicaba un fenotipo de movilidad, y además, el gen adyacente a *kinB* se transcribe en sentido contrario. Aún así, se introdujo por conjugación el plásmido pBG1708 que contiene clonados *algB* y *kinB* bajo el control de su propio promotor. La expresión del plásmido en el mutante *algB* no tuvo ningún efecto, mientras que en el mutante *kinB* supuso la restauración de la movilidad tipo *swimming* a los niveles de la cepa silvestre.

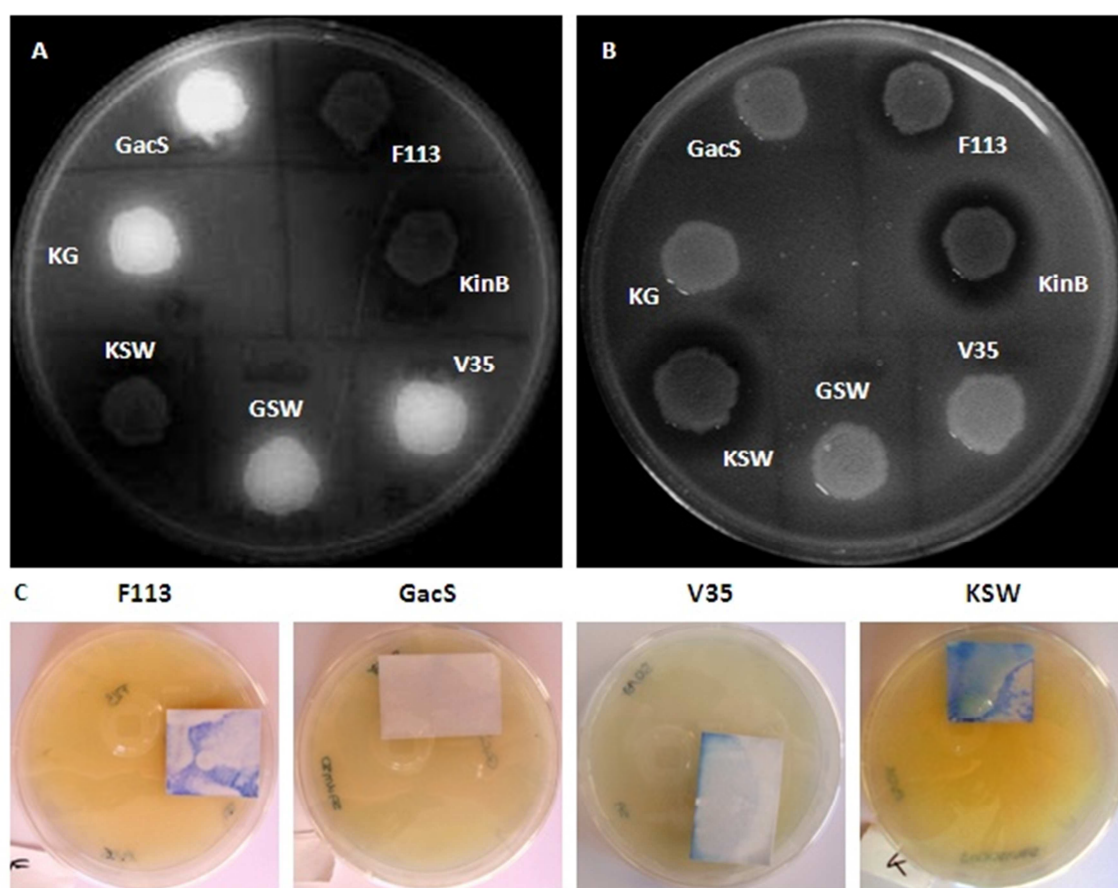
Trabajos previos en el laboratorio, han mostrado la existencia de al menos tres rutas independientes que están regulando la movilidad en *P. fluorescens* F113 (Navazo y col., 2009). Por este motivo, quisimos averiguar si el gen *kinB* tenía relación con alguna de estas rutas de regulación, para lo cual, construimos dobles mutantes siempre afectados en el gen *kinB*, y además, en uno de los otros genes que definían cada una de las tres rutas: *gacS*, *sadB* y *wspR*. En la figura 3.1 se puede apreciar como los dobles mutantes *kinBsadB* (KS) y *kinBwspR* (KW) presentaron un fenotipo aditivo en lo que a la movilidad tipo *swimming* se refiere, indicando que el gen *kinB* está participando en rutas de regulación diferentes a las descritas por SadB y WspR.



**Fig. 3.1:** Movilidad tipo *swimming*. Halos de movilidad producidos por F113, los mutantes simples y dobles, *gacS*, *kinB*, *algB*, *kinBgacS* (KG), *kinBsadB* (KS), *kinBwspR* (KW), el variante fenotípico 35 (V35), y los triples mutantes *gacSsadbwspR* (GSW) y *kinBsadbwspR* (KSW) tras 18 horas desde la inoculación en la placa. Se muestra la media y la desviación típica de cuatro réplicas de cada cepa. Las diferentes letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias en las tasas de crecimiento en ninguna de las cepas utilizadas en el ensayo. El fenotipo de movilidad de los mutantes *sadB* y *wspR* ya ha sido mostrado con anterioridad (Navazo y col., 2009).

En cambio, el doble mutante *kinBgacS* (KG), mostraba un halo de movilidad similar al de un mutante *gacS*, es decir, los fenotipos de movilidad tipo *swimming* entre estas cepas eran

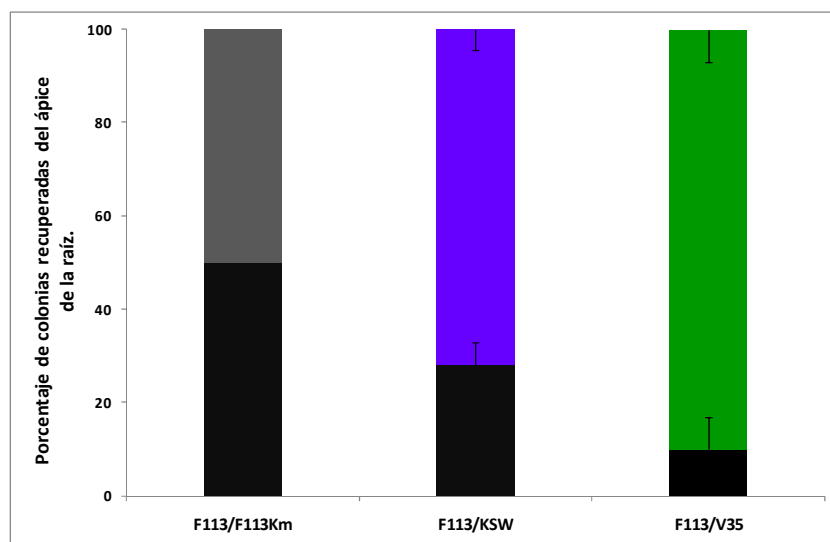
idénticos (Fig. 3.1). Este hecho conduce a afirmar que ambos genes están en la misma ruta de regulación, y que además, *gacS* es epistático sobre *kinB*. Una mutación *gacS* implica que la cepa portadora está afectada en el metabolismo secundario, es decir, que entre otras cosas, presenta bloqueada la producción de exoproteasa y sobreproduce pioverdina en medio rico en hierro (Martínez-Granero y col., 2005). Por esta razón, realizamos las pruebas pertinentes para detectar si los mutantes *kinB* y KG estaban afectados o no en el metabolismo secundario. Como se muestra en la Figura 3.2A y B, el mutante *kinB* tenía el mismo fenotipo que la cepa silvestre, una producción normal de exoproteasa y pioverdina, mientras que el doble mutante KG mostró un fenotipo similar al de un mutante simple *gacS* para ambos caracteres. Estos resultados permiten corroborar que en la represión de la movilidad tipo *swimming*, *gacS* está actuando a través de *kinB*.



**Fig. 3.2:** Determinación de alteraciones en el metabolismo secundario. **A.** Producción de pioverdina: La imagen corresponde a las distintas cepas crecidas en un medio rico en hierro (LB). Tras 24 horas de incubación a 28°C, se expusieron a luz ultravioleta para detectar que cepas producían el sideróforo. Como se observa, todas las cepas con mutación *gacS* sobreproducen pioverdina. **B.** Producción de exoproteasa: La imagen corresponde a las distintas cepas crecidas en medio de exoproteasa. Tras 48 horas de incubación a 28°C, se determinó la ausencia o presencia de halo de degradación. Las cepas que producen un halo de degradación del medio son todas aquellas que no portan mutaciones *gacS*, lo que ocurre con F113, KinB y KSW. **C.** Producción de ácido cianhídrico: Después de 40 horas a 28°C de incubación de las cuatro cepas ensayadas F113, GacS, V35 y KSW, la producción de HCN se detectó por el cambio de color del papel revelador de blanco a azul. Las cepas que producen HCN son aquellas que no tienen alterado el sistema de dos componentes GacA/GacS.

También se llevó a cabo la construcción de un triple mutante *kinBsadBwspR* (KSW). Esta nueva cepa hipermóvil, presentó un fenotipo de movilidad tipo *swimming* equivalente al anteriormente descrito para otro triple mutante elaborado en el laboratorio, *gacSsadBwspR* (GSW) y al de un variante fenotípico seleccionado y aislado de la rizosfera (V35) (Martínez-Granero y col., 2006) (Fig. 3.1). Al igual que estas dos cepas, el mutante KSW estaba muy afectado en la formación de biopelículas en superficies abióticas. Tanto el triple mutante GSW, como el variante fenotípico V35, son cepas que colonizan competitivamente la rizosfera. En estudios anteriores determinamos como estas dos cepas que se mueven casi 3 veces más que la cepa silvestre, desplazan claramente a ésta cuando colonizan la raíz (Barahona y col., 2010; Martínez-Granero y col., 2006). Por este motivo, decidimos ver cuál era el comportamiento que presentaba el triple mutante KSW durante este mismo proceso, realizando para ello un ensayo de competitividad en el meristemo de la raíz principal de alfalfa (Capdevila y col., 2004).

Como se muestra en la Figura 3.3, el mutante KSW es más competitivo que la cepa silvestre, siendo capaz de desplazar a ésta del ápice radicular. Además, este nuevo mutante presenta una producción normal de pioverdina (Fig. 3.2A), de exoproteasa (Fig. 3.2B) y de ácido cianhídrico (Fig. 3.2C). El hecho de que no presente alteraciones en el metabolismo secundario, podría hacer a esta cepa potencialmente apta para su uso en procesos de biocontrol. La hipótesis que proponemos, es que las cepas que son excelentes colonizadores de la rizosfera, también serán más hábiles que la cepa silvestre a la hora de biocontrolar hongos patógenos. Para corroborarlo, comparamos la capacidad de biocontrol del mutante KSW frente a la de F113 y V35; una cepa hipercompetitiva pero portadora de mutaciones *gac*, es decir, con alteraciones en el metabolismo secundario.



**Fig. 3.3:** Colonización competitiva de la rizosfera. La cepa silvestre se utilizó como cepa competidora en todos los ensayos. Las plantas de alfalfa se inocularon con las cepas (KSW o V35 y F113) en proporciones 1:1. Después de 2 semanas, a cada planta se le seccionó el ápice de su raíz principal y se sembraron en placas las bacterias colonizadoras. Las barras negras corresponden al porcentaje de colonias de F113 recuperadas del ápice. Las barras de colores se refieren al porcentaje de colonias de las cepas analizadas recuperadas del ápice de la raíz. En el ensayo F113/KSW, el 70% de las colonias recuperadas son del triple mutante. En el ensayo F113/V35, casi el 90% del total de colonias recuperadas, son del variante fenotípico. El promedio de las bacterias recuperadas fue  $3.63 \times 10^6$  ufc/gr de ápice radicular (peso fresco).

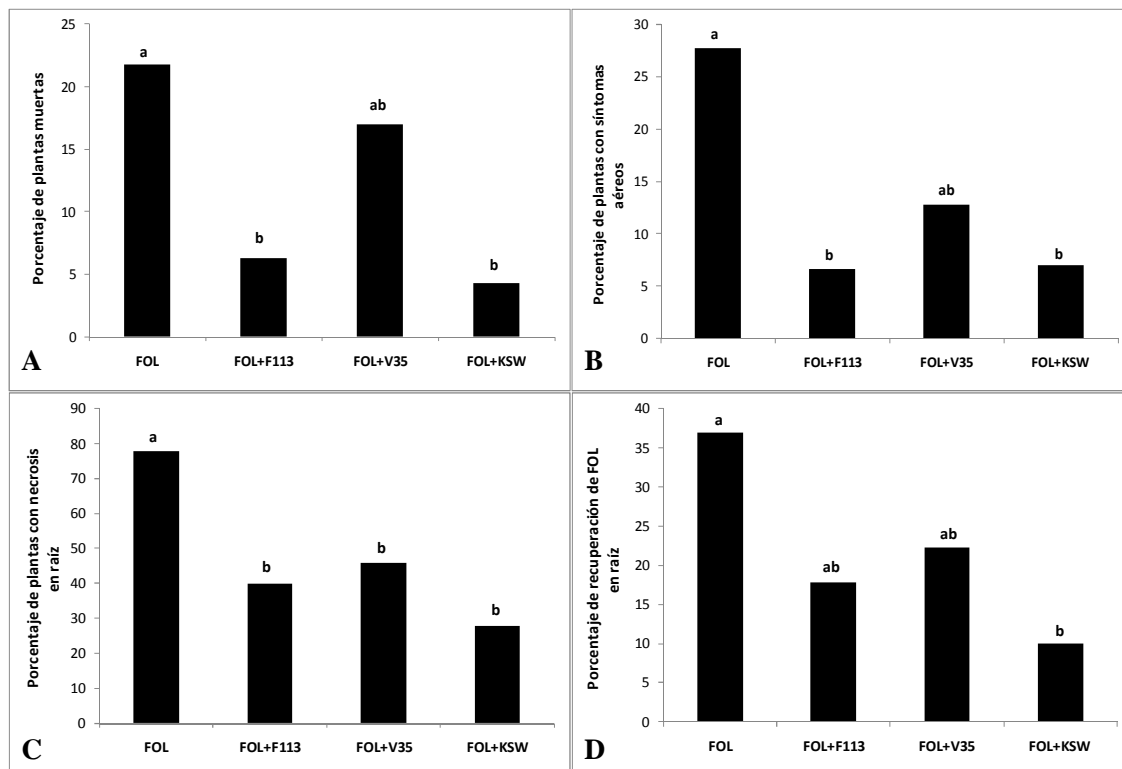
### Análisis de biocontrol en plantas de tomate.

El primer modelo planta/patógeno utilizado en este trabajo fue plantas de tomate infectadas con el hongo *Fusarium oxysporum* sp. *Lycopersici* (FOL).

Como se muestra en la Figura 4, la infección con el fitopatógeno supuso una serie de efectos severos en las plantas de tomate: más del 20% de las plantas estaban muertas tras 21 días desde la inoculación de FOL (Fig. 3.4A), y del total, un 83% de las plantas murieron o presentaron diversos síntomas de enfermedad, lo que indica el alto grado de infección de FOL. El 27% de las plantas supervivientes mostraron síntomas de enfermedad en la parte aérea, que consistían en fenómenos de clorosis en hojas y aparición de puntos necróticos (Fig. 3.4B). Pero los daños más agudos se observaron en la zona radicular, ya que el 75% de las plantas infectadas con FOL presentaron también necrosis en esta región (Fig. 3.4C).

Además, en el tratamiento en el que las plantas únicamente estaban inoculadas con el patógeno, éste se recuperó del 37% de las raíces (Fig. 3.4D). La inoculación con cualquiera de las tres cepas supuso una disminución de la infección: las plantas sintomáticas sumadas a las muertas fueron un 44%, cuando la bacteria inoculada fue la cepa silvestre, un 49% cuando se inocularon con V35 y un 33% cuando la cepa a ensayar fue KSW. Este mismo patrón se obtuvo

para todos los parámetros estudiados, lo cual significa que las tres cepas presentaban capacidad de biocontrol (Fig. 3.4).



**Fig. 3.4:** Análisis de biocontrol en el sistema *Fusarium oxysporum* sp. *Lycopersici*/*Lycopersicum esculentum* (tomate) después de 21 días desde la inoculación de fitopatógeno: FOL: tratamiento con *Fusarium oxysporum*; FOL+F113: tratamiento con el hongo y *P. fluorescens* F113; FOL+V35: tratamiento con el hongo y el variante fenotípico 35; FOL+KSW: tratamiento con el hongo y el triple mutante *kinBsadBwspR*. **A.** Porcentaje del total de plantas muertas en cada tratamiento. **B.** Porcentaje de plantas no muertas que presentaban síntomas aéreos. **C.** Porcentaje de plantas no muertas que presentaban necrosis en la zona radicular. **D.** Porcentaje de recuperación del hongo de la zona de la raíz. Las diferentes letras indican la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Si analizamos cualquiera de los parámetros estudiados, observamos que siguen el mismo patrón, siendo el variante V35 la cepa con menos habilidad de biocontrol. Aunque los valores medios de cada uno de los ensayos fueron menores en los tratamientos inoculados con V35, cuando lo comparamos con las plantas no bacterizadas, únicamente se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el parámetro que se refiere a la presencia de necrosis en la raíz (Fig. 3.4C). Por el contrario, un efecto claro de capacidad de biocontrol se detectó en las plantas infectadas con el fitopatógeno y que además estaban inoculadas con la cepa silvestre F113 o con el triple mutante KSW. En todos los casos existieron diferencias estadísticamente

significativas ( $p < 0.05$ ), salvo en el parámetro que indica la recuperación del hongo patógeno de la zona radicular en el tratamiento FOL+F113 (Fig. 3.4D).

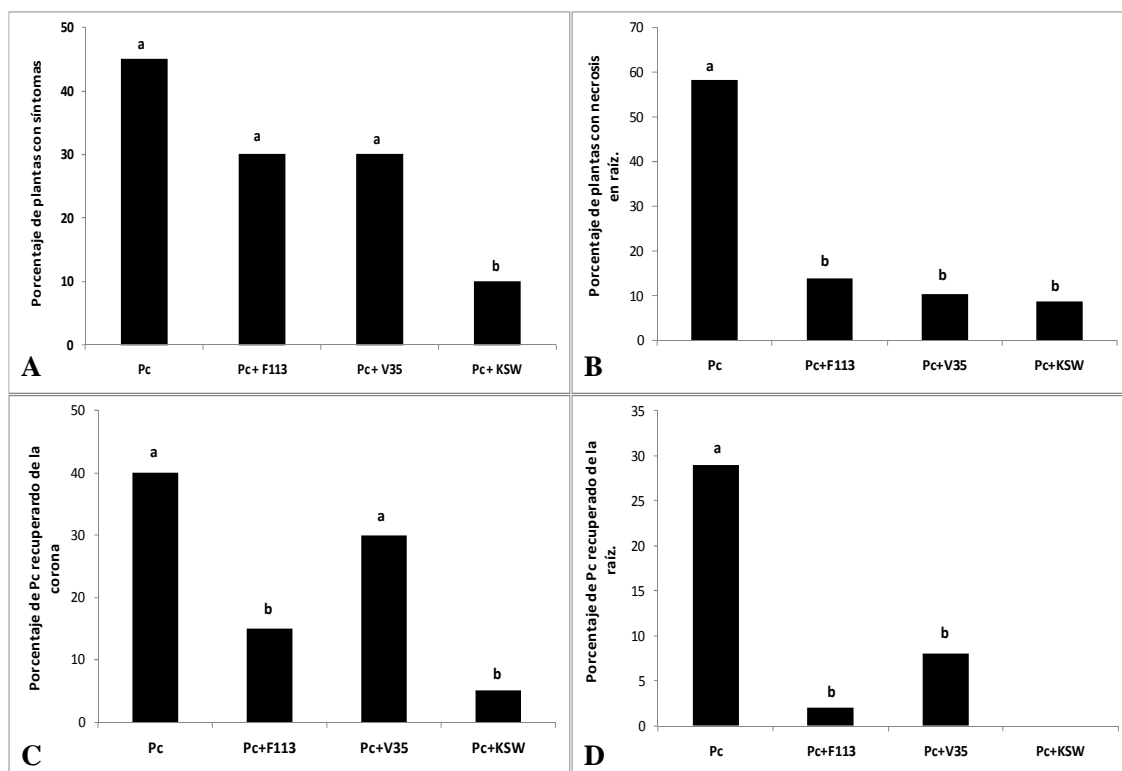
Cuando comparamos los efectos entre los tratamientos que fueron inoculados con la cepa silvestre o los que lo fueron con el triple mutante, observamos que la cepa KSW parece ser un mejor agente de control biológico. No obstante, no se observaron diferencias significativas entre F113 y KSW ( $p < 0.05$ ).

### **Análisis de biocontrol en plantas de fresa**

Las mismas tres cepas fueron utilizadas en el segundo modelo planta/patógeno empleado en este trabajo: *Phytophthora cactorum* (Pc)/*Fragaria vesca* (fresa).

La figura 3.5 muestra como este oomicete patógeno causa graves daños en las plantas de fresa, afectando especialmente a todo el sistema radicular, así como a la zona de la corona. El 15% del total de plantas inoculadas con el fitopatógeno resultaron muertas después de 15 días de proceso de infección y un 70% del total de las plantas estaban infectadas (plantas muertas más plantas con síntomas). Los síntomas de enfermedad más patentes fueron la aparición de necrosis tanto en la base del tallo como en las raíces, de hecho, el 60% de las plantas supervivientes presentaban estos daños severos (Fig. 3.5B). Los síntomas de daño en la parte aérea se detectaron en el 45% de las plantas supervivientes (Fig. 3.5A).

En este experimento se aisló *P. cactorum* de la corona y de las raíces, obteniéndose un porcentaje de recuperación del hongo del 40% (Fig. 3.5C) y 27% (Fig. 3.5D), respectivamente. La inoculación con cualquiera de las tres cepas supuso que todas las plantas del tratamiento viviesen, y por tanto, hubo una clara reducción de las plantas con daños, que fue del 35% cuando se inoculó la cepa silvestre, un 40% cuando fue el V35 y un 25% en el caso de KSW. Hubo también una reducción clara del porcentaje del patógeno recuperado de la corona y de la raíz (Fig. 3.5C y D), indicando de nuevo que las tres cepas tienen capacidad de controlar al patógeno.



**Fig. 3.5:** Análisis de biocontrol en el sistema *Phytophthora cactorum* (Pc)/ *Fragaria vesca* (fresa) tras 2 semanas desde la inoculación de fitopatógeno: Pc: tratamiento con *Phytophthora cactorum*; Pc+F113: tratamiento con el oomicete y *P. fluorescens* F113; Pc+V35: tratamiento con el oomicete y el variante fenotípico 35; Pc+KSW: tratamiento con el oomicete y el triple mutante *kinBsadBwspR*. **A.** Porcentaje del total de plantas con síntomas aéreos en cada tratamiento. **B.** Porcentaje de plantas que presentaban zonas necróticas en el sistema radicular. **C.** Porcentaje de recuperación de Pc en la zona de la corona. **D.** Porcentaje de recuperación de Pc en las raíces. Las diferentes letras indican la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Como en el ensayo anterior del sistema tomate-FOL, el variante 35 presentó los peores resultados de habilidad de biocontrol, especialmente cuando observamos los resultados de reaislamiento del fitopatógeno de la corona, donde no se detectan diferencias significativas cuando los comparamos con las plantas de fresa que únicamente fueron infectadas con Pc ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3.5C). Todo lo contrario a lo que ocurrió en los tratamientos inoculados con la cepa silvestre o el triple mutante KSW, porque en estos casos, siempre hubo una reducción significativa de la recuperación del hongo con respecto al tratamiento no bacterizado. Cuando analizamos a fondo y comparamos los datos entre F113 y KSW, vemos que el triple mutante siempre presenta mejores resultados que la cepa silvestre, y además, hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) tanto en los recuentos de plantas sintomáticas (30% para la cepa silvestre contra el 10% de KSW) como en la recuperación de patógeno de la raíz: *P. cactorum* no fue reaislado de ninguna planta de fresa en el tratamiento en el que el triple mutante fue inoculado, mientras que se obtuvo que un pequeño porcentaje de recuperación cuando el inoculante era la cepa silvestre.



## DISCUSIÓN

*P. fluorescens* F113 es una rizobacteria utilizada para el control biológico de hongos fitopatógenos, y en ensayos *in vitro* es capaz de inhibir el crecimiento de varios hongos y oomicetos, incluyendo *Pythium ultimum*, *Phoma betae*, *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium oxysporum* (Shanahan y col., 1992). La actividad de controlar a *P. ultimum* por parte de F113 se ha descrito en remolacha (Fenton y col., 1992) y guisante (Bainton y col., 2004; Naseby y col., 2001), y para *Rhizoctonia solani* también en remolacha (Russo y col., 2001). Además, se ha propuesto como bacteria con capacidad de biocontrol contra la acción del nematodo *Globoder rostoechensis* en patata (Cronin y col., 1997). En todos estos casos comentados, siempre se ha relacionado la capacidad de atenuar al patógeno con la producción del fungicida DAPG. En este trabajo seguimos analizando la capacidad de biocontrol de F113, pero en dos nuevos patosistemas: *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FOL)/*Lycopersicon esculentum* (tomate) y *Phytophthora cactorum* (Pc)/*Fragaria vesca* (fresa).

La movilidad bacteriana se ha considerado y descrito como uno de los factores más importantes tanto para la colonización de la rizosfera como para el proceso de biocontrol. De hecho, mutantes inmóviles o con movilidad reducida y mutantes afectados en quimiotaxis, se encuentran entre las cepas que peor se comportan en los experimentos de colonización competitiva de la raíz (Capdevilla y col., 2004; de Weert y col., 2002; Simons y col., 1996). No obstante, el ambiente rizosférico selecciona variantes fenotípicos hipermóviles, capaces de colonizar las zonas más lejanas al sitio de inoculación (Martínez-Granero y col., 2006; Sánchez-Contreras y col., 2002). El fenómeno de movilidad en las bacterias es un proceso que se puede cuantificar, y podemos aislar mutantes que presentan diferentes grados de movilidad tipo *swimming* (Martínez-Granero y col., 2006). En estudios previos hemos mostrado que el movimiento de *P. fluorescens* F113 depende del control de múltiples genes que además están actuando en distintas rutas de regulación. Concretamente, existen al menos tres rutas de regulación independientes que se encargan de modular la movilidad: la ruta mediada por el sistema de dos componentes GasAS, la ruta mediada por la proteína citoplasmática SadB, y la mediada por WspR (Navazo y col., 2009).

En este trabajo demostramos como el gen *kinB* también está reprimiendo la movilidad tipo *swimming* en nuestra cepa de estudio, y que además lo hace independientemente de las rutas controladas por SadB y WspR. Este hecho está basado en la observación de que los dobles mutantes *kinBsadB* o *kinBwspR* mostraron un fenotipo aditivo (Fig. 3.1). También hemos mostrado que el gen *kinB* actúa de forma independiente a su regulador de respuesta

AlgB, ya que la mutación en el gen *algB* no implica cambios en la movilidad con respecto a la cepa silvestre. Resulta interesante comentar que en *P. aeruginosa*, la actividad de AlgB en relación con la biosíntesis del expolisacárido alginato se ha demostrado en ausencia de la fosforilación mediada por KinB (Ma y col., 1998), lo que confirma que AlgB/KinB forman un sistema atípico de dos componentes. Recientemente, se ha definido que KinB en *P. aeruginosa*, es un importante determinante de los factores de virulencia, como la regulación de la movilidad, el *quorum sensing* y la formación de biopelículas. Todas estas actividades son independientes de su actividad quinasa y de su regulador de respuesta AlgB (Chand y col., 2011).

Por otro lado, los análisis de epistasia llevados a cabo demuestran que el gen *kinB* se encuentra en la misma ruta que el sistema de dos componentes GacAS, actuando siempre por debajo de *gacA* y *gacS*. En *P. fluorescens*, los mutantes Gac están afectados en el metabolismo secundario, siendo incapaces de producir metabolitos secundarios que parecen ser imprescindibles y relevantes para los procesos relacionados con el biocontrol de fitopatógenos, como por ejemplo, el fungicida DAPG (Aarons y col., 2000; Zuber y col., 2003), el ácido cianhídrico (Aarons y col., 2000; Blummer y col., 1999) y las metaloproteasas extracelulares (Blummer y col., 1999). Por tanto, estas cepas portadoras de mutaciones en el sistema de dos componentes GacAS son poco idóneas para su uso en biocontrol. Como ya hemos comentado, en el presente trabajo mostramos que aunque una mutación en *kinB* esté afectando en la misma ruta que una mutación *gac*, el gen *kinB* se encuentra ejerciendo su actividad por debajo de los genes *gacAS*, lo que conlleva que una cepa portadora de una mutación *kinB*, muestre un fenotipo para el metabolismo secundario idéntico al de la cepa silvestre, como se observa en la producción de pioverdina y exoproteasa (Fig. 3.2).

Todos estos resultados, junto con el hecho de que el triple mutante KSW es más competitivo que la cepa silvestre durante la colonización de la rizosfera (Fig. 3.3) y que conserva intacto el metabolismo secundario, nos condujo a pensar que era una cepa con buenas perspectivas para ser utilizada en biocontrol. En la bibliografía se pueden encontrar trabajos donde se describe que una eficiente colonización de la rizosfera es un requisito previo para que tenga lugar un proceso de biocontrol eficaz. . Es el caso de *Pseudomonas chlororaphis* PCJ1391, bacteria capaz de controlar a FOL gracias a la producción de fenacina-1-carboximida; se ha observado que mutantes afectados en la colonización de plantas de tomate no son capaces de realizar biocontrol de FOL (Chin-A-Woeng y col., 2000). Por tanto, es posible pensar que aquellas cepas hipercompetitivas podrían desempeñar un mejor papel en procesos de

biocontrol que la cepa silvestre, y los resultados obtenidos en este trabajo, utilizando dos sistemas patogénicos bajo condiciones de invernadero (Tomate-FOL y Fresa-Pc), confirman esta hipótesis.

En el caso del variante 35, se obtuvieron resultados muy similares en ambos sistemas. Esta cepa con alteración en el metabolismo secundario, se comportó peor en los estudios de biocontrol para todos los parámetros analizados. Estos datos obtenidos nos están indicando que la producción de metabolitos secundarios podría ser muy importante, quizá el factor más determinante para la atenuación de hongos patógenos por parte de *P. fluorescens* F113. No obstante, debe de haber otros factores implicados en biocontrol que sean independientes del sistema GacAS, porque aunque V35 presenta mutaciones *gac*, posee una actividad de biocontrol significativa en ambos patosistemas.

Cuando comparamos los datos obtenidos de la cepa silvestre y del triple mutante hipermóvil KSW, observamos que son bastante similares para ambos sistemas planta/patógeno: el mutante KSW muestra un mejor comportamiento que F113 en los ensayos de biocontrol. Los resultados son especialmente claros en el caso del patosistema Fresa-Pc. En este caso se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas, tanto para el porcentaje de plantas sintomáticas como para la recuperación del hongo patógeno de la raíz, que no pudo ser recuperado de ninguna planta cuando estas fueron inoculadas con el triple mutante. Ya que ambas cepas son isogénicas, compartiendo un fondo genético común, los distintos comportamientos podrían atribuirse a diferencias en la movilidad y la colonización competitiva. En este sentido, es importante comentar que las cepas hipermóviles e hipercompetitivas, y los variantes fenotípicos derivados de F113 no difieren de la cepa silvestre ni en los niveles de colonización, ni en los sitios que ocupan en la rizosfera, ni en los patrones de colonización, cuando son inoculadas de forma individual (Barahona y col., 2010). Uno de los factores más relevantes que se han utilizado para seleccionar a los mejores agentes de control biológico, es la colonización competitiva (Pliego y col., 2007, Validov y col., 2007). En este estudio demostramos que el aumento de la colonización competitiva de la rizosfera, manipulando caracteres conocidos puede ser relevante para este proceso, y además, implica un incremento en el biocontrol de hongos patógenos de las raíces de las plantas. También mostramos que es posible diseñar cepas que presenten una mayor capacidad de biontrol mediante mutagénesis dirigida.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aarons S., Abbas A., Adams C., Fenton A., y O'Gara F. (2000). A regulatory RNA (Prrb RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* **182**: 3913-3919.
- Aguirre de Cárcer D., Martín M., Karlson U. y Rivilla R. (2007a). Changes in bacterial populations and in biphenyl dioxygenase gene diversity in a PCB polluted soil after introducing willow trees for rhizoremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6224-6232.
- Aguirre de Cárcer D., Martín M., Karlson U., y Rivilla R. (2007b). Changes in bacterial populations and in biphenyl dioxygenase gene diversity in a polychlorinated biphenyl-polluted soil after introduction of willow trees for rhizoremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6224-6232.
- Bainton N.J., Lynch J.M., Naseby D., y Way J.A. (2004). Survival and ecological fitness of *Pseudomonas fluorescens* genetically engineered with dual biocontrol mechanisms. *Microb. Ecol.* **48**: 349-357.
- Barahona E., Navazo A., Yousef-Coronado F., Aguirre de Cárcer D., Martínez-Granero F., Espinosa-Urgel M., Martín M., y Rivilla R. (2010). Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environ. Microbiol.* **12**: 3185-3195.
- Blumer C., Heeb S., Pessi G., y Haas D. (1999). Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**: 14073-14078.
- Brazil G.M., Kenefick L., Callanan M., Haro A., de Lorenzo V., Dowling D.N. y O'Gara F. (1995). Construction of a rhizosphere pseudomonad with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of bph gene expression in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1946-1952.
- Caiazza N.C., y O'Toole G.A. (2004). SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* **186**: 4476-4485.
- Capdevila S., Martínez-Granero F., Sánchez-Contreras M., Rivilla R., y Martín M. (2004). Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiol.* **150**: 3889-3897.
- Castric K.F. y Castric P.A. (1983). Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **45**: 701-702.
- Chand N.S., Lee J.S., Clatworthy A.E., Golas A.J., Smith R.S. y Hung D.T. (2011). The sensor kinase KinB regulates virulence in acute *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.01546-10.
- Chin-A-Woeng T.F., Bloemberg G.V., Mulders I.H., Dekkers L.C., y Lugtenberg B.J. (2000). Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1340-1345.
- Cronin D., Moenne-Loccoz Y., Fenton A., Dunne C., Dowling D.N., y O'Gara F. (1997). Role of 2,4-Diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1357-1361.

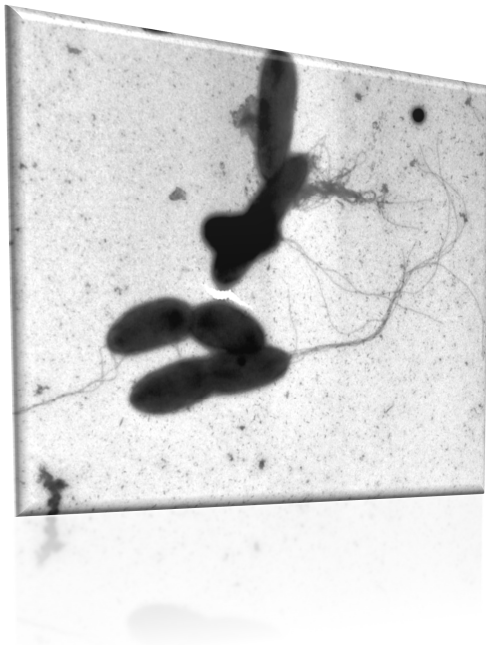
- Dekkers L.C., Mulders I.H.M., Phoelich C.C., Ching-A-Woeng T.F.C., Wijfjes A.H.M., y Lugtenberg B.J.J.** (2000). The sss colonization gene of the tomato *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. *Bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1177-1183.
- de Weert S., Vermeiren H., Mulders I.H.M., Kuiper I., Hendrickx N., Bloembergen G.V., Vanderleyden J., De Mot R., y Lugtenberg B.J.** (2002). Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 1173–1180.
- Erwin D.C., y Ribeiro O.K.** (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. APS Press, MN, USA.
- Fahraeus G.** (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by simple glass technique. *J. Gen.* **16**: 374-381.
- Fenton A.M., Stephens P.M., Crowley J., O'Callaghan M., y O'Gara F.** (1992). Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3873-3878.
- Figurski D.H., y Helinski D.R.** (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provide in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **76**: 1648-1652.
- Finan T.M., Kunkel B., De Vos G.F., y Signer E.R.** (1986). Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* **167**: 66–72.
- Hickman J.W., Tifrea D.F., y Harwood C.S.** (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**: 14422-14427.
- Kamilova F., Leveau J.H., y Lugtenberg B.** (2007). *Collimonas fungivorans*, an unpredicted *in vitro* but efficient *in vivo* biocontrol agent for the suppression of tomato foot and root rot. *Environ. Microbiol.* **9**: 1597-1603.
- Kirchner O., y Tauch A.** (2003). Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**: 287–299.
- Ma S., Selvaraj U, Ohman D.E, Quarless R, Hassett D.J., y Wozniak D.J.** (1998). Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **180**: 956–968.
- Martínez-Granero F., Capdevila S., Sánchez Contreras M., Martín M., y Rivilla R.** (2005). Two sites-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol.* **151**: 975-983.
- Martínez-Granero F., Rivilla R., y Martín M.** (2006). Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3429-3434.
- Naseby D.C., y Lynch J.M.** (1999). Effects of *Pseudomonas fluorescens* F113 on ecological functions in the pea rhizosphere are dependent on pH. *Microb. Ecol.* **37**: 248-256.

- Naseby D.C., Way J.A, Bainton N.J., y Lynch J.M.** (2001). Biocontrol of *Pythium* in the pea rhizosphere by antifungal metabolite producing and non-producing *Pseudomonas* strains. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 421-429.
- Navazo A., Barahona E., Redondo-Nieto M., Martínez-Granero F., Rivilla R., y Martín M.** (2009). Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microb. Biotechnol.* **2**: 489–498.
- Pliego C., Cazorla F.M., González-Sánchez M.A., Pérez-Jiménez R.M., de Vicente A., y Ramos C.** (2007). Selection for biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. *Res. Microbiol.* **10**: 3295-3304.
- Pliego C., de Weert S., Lamers G., de Vicente A., Bloemberg G., Cazorla F.M., y Ramos C.** (2008). Two similar enhanced root-colonizing *Pseudomonas* strains differ largely in their colonization strategies of avocado roots and *Rosellinia necatrix* hyphae. *Environ. Microbiol.* **10**: 3295-3304.
- Russo A., Basaglia M., Tola E, y Casella S.** (2001). Survival, root colonization and biocontrol capacities of *Pseudomonas fluorescens* F113 LacZY in dry alginate microbeads. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 337-342.
- Sánchez-Contreras M., Martín M., Villaceros M., O’Gara F., Bonilla I., y Rivilla R.** (2002). Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* **184**: 1587-1596.
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., y Pühler A.** (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* **145**: 69-73.
- Scher F.M., y Baker R.** (1982). Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology.* **72**: 1567-1573.
- Shanahan P., O’Sullivan D.J., Simpson P., Glennon J.D., y O’Gara F.** (1992). Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 353-358.
- Simons M., van der Bij A.J., Brand I., de Weger L.A., Wijffelman C.A., y Lugtenberg B.J.J.** (1996). Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 600–607.
- Thom C., y Raper K. B..** (1945). Manual of aspergilli. The Williams & Wilkins Co., *Baltimore, Md.*
- Validov S., Kamilova F., Qi S., Stephan D., Wang J.J., Makarova N., y Lugtenberg B.** (2007). Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in stonewool substrate. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 461-471.
- Villaceros M., Whelan C., Mackova M., Molgaard J., Sánchez-Contreras M., Lloret J., Aguirre de Cárcer D., Oruezábal R.I., Bolaños L., Macek T., Karlson U., Dowling D.N., Martín M., y Rivilla R.** (2005). Polychlorinated biphenyl rhizoremediation by *Pseudomonas fluorescens* F113 derivatives, using a *Sinorhizobium meliloti* nod system to drive bph gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2687-2694.

**Zuber S., Carruthers F., Keel C., Mattart A., Blumer C., Pessi G., Gigot-Bonnefoy C., Schnider-Keel U., Heeb, S., Reimann C., y Haas D.** (2003). GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 634-644.







## ***CAPÍTULO 4***

---

***Pseudomonas fluorescens* F113 produce un segundo aparato flagelar que es importante para la colonización de la rizosfera.**



## RESUMEN

La movilidad dependiente de flagelos es una característica muy importante que permite a las rizobacterias colonizar eficientemente la raíz de las plantas. *Pseudomonas fluorescens* F113 presenta una flagelación típica del género *Pseudomonas*, ya que posee uno o dos flagelos que se disponen en uno de los polos de la bacteria. Pero además, la secuenciación del genoma de *P. fluorescens* F113, ha revelado que su cromosoma contiene un conjunto de genes que codifican un segundo aparato flagelar, que por homología, está muy relacionado con el de *Azotobacter vinelandii* DJ, bacteria de suelo Gram negativa y muy cercana al género *Pseudomonas*. Aunque en condiciones de laboratorio este segundo flagelo no es producido por la cepa silvestre, los mutantes en el gen *kinB*, son capaces de producirlo. La mayor capacidad de movimiento del mutante *kinB*, no es debida a la sobreproducción de flagelina FliC, típica del flagelo de *Pseudomonas*, sino a la biosíntesis de este segundo aparato flagelar. Además, la expresión ectópica en la cepa silvestre del regulador principal *flhDC*, es suficiente para que se sintetice este nuevo flagelo y haya un considerable aumento de la movilidad en F113. La síntesis de este segundo flagelo está controlada por el gen *cyaA*, que codifica una enzima con actividad adenilato ciclasa, y por *vfr*, que codifica el factor Vfr dependiente de AMPc, los cuales a su vez podrían estar regulando positivamente a *flhDC*. El comportamiento en movilidad de los dobles mutantes *kinBcyaA* y *kinBvfr*, sugiere que el gen *kinB* reprime la producción del segundo flagelo. El análisis fenotípico del mutante en el gen *fliC2*, que codifica la proteína estructural del segundo flagelo, y del doble mutante *kinBfliC2*, ha revelado una disminución drástica de su competitividad. La pérdida de competitividad en el proceso de colonización por falta de producción del segundo flagelo, junto con la detección de la expresión de éste en variantes fenotípicos hipermóviles aislados de la rizosfera, indica la importancia del segundo aparato flagelar en el proceso de colonización competitiva de la rizosfera.

## INTRODUCCIÓN

La movilidad bacteriana tipo *swimming* es dependiente del flagelo, orgánulo cuya biogénesis y estructura ha sido muy estudiada (Aldridge y Hughes, 2002; Apel y Surette, 2008; Chilcott y Hughes, 2000; Macnab, 1999; Macnab, 2003; Thormann y Paulick, 2010). Este tipo de movilidad, contribuye a aumentar la capacidad de virulencia de muchas especies bacterianas (Akerley y col., 1995; Schmitt y col., 1994), sin embargo, también es responsable de que otras puedan colonizar a sus hospedadores y producir beneficios (Chin-A-Woeng y col., 2000; Kamilova y col., 2005).

*Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, son las cepas bacterianas más utilizadas para estudiar e identificar el conjunto de genes que intervienen en la biogénesis y autoensamblaje del aparato flagelar (Chilcott y Hughes, 2000; Macnab, 2003). Estas Enterobacterias, se mueven por medio de flagelos peritricos y su biosíntesis requiere la expresión regulada de aproximadamente 50 genes que se localizan agrupados en diferentes zonas del cromosoma (Macnab, 2003). La transcripción de estos genes tiene lugar de manera muy ordenada y jerarquizada, ya que la expresión de cualquier gen situado en un determinado nivel, depende de la transcripción de otro situado en un nivel superior. En el nivel más alto de esta cascada de regulación se encuentra el regulador principal *flhDC*, cuyos productos, FlhD y FlhC, son responsables de la activación de todo el regulón flagelar (Aldridge y Hughes, 2002; Liu y Matsumura, 1994). FlhD y FlhC estarían regulando positivamente la síntesis de proteínas implicadas en la formación del cuerpo basal y el gancho, como FliA, que es un factor sigma necesario para la expresión de varios genes, entre ellos, *fliC* o *flgM*, que codifica el factor anti-sigma que regula a FliA.

A su vez, el regulador principal *flhDC* se encuentra controlado por un sistema dependiente de AMPc (adenosín monofosfato-3',5' cíclico) (Soutourina y col., 1999), denominado sistema de represión catabólica dependiente de AMPc o CRS dependiente de AMPc (del inglés *Catabolic Repression System*). La célula bacteriana responde a la disponibilidad de glucosa mediante la regulación intracelular de este segundo mensajero, por lo que, en respuesta a variaciones en las fuentes de carbono, Cya (adenilato ciclasa) cataliza la formación de AMPc. La proteína CRP se une al AMPc (CRP-AMPc) formando un complejo que no sólo está implicado en la regulación positiva de varias funciones catabólicas, sino que también es requerido para otros cometidos, como la síntesis del flagelo (Botsford y Harman, 1992).

Dentro del grupo de las *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa* es la cepa modelo que se ha utilizado para el estudio de la regulación de genes responsables de la síntesis del flagelo polar. A diferencia de Enterobacterias, la regulación es más compleja, siendo FleQ el regulador principal (Arora y col., 1997; Dasgupta y col., 2003). FleQ y el factor sigma RpoN o  $\sigma^{54}$ , controlan directa o indirectamente la expresión de la mayoría de los genes flagelares, con excepción del factor sigma FliA (Arora y col., 1997; Dasgupta y col., 2003; Jyot y col., 2002). A su vez, FleQ se encuentra finamente regulado por el factor  $\sigma^{70}$ , que podría estar activando su transcripción (Dasgupta y col., 2002), mientras que Vfr (homólogo de CRP de *E.coli*), MorA, AmrZ, FleN y AlgU ( $\sigma^{22}$ ), la reprimen (Choy y col., 2004; Dasgupta y col., 2002; Dasgupta y Ramphal, 2001; Garret y col., 1999; Tart y col., 2005).

En *P. aeruginosa*, la expresión de muchos factores de virulencia que incluyen sistemas de secreción tipo III, elastasa, exotoxina A, pili tipo IV y proteasa tipo IV son dependientes del segundo mensajero AMPc, que es sintetizado por dos enzimas con actividad adenilato ciclasa, CyaA y CyaB; y del factor Vfr dependiente de AMPc (Beatson y col., 2002; Fulcher y col., 2010; Jones y col., 2010; West y col., 1994), lo que sugiere que este complejo Vfr-AMPc también podría estar controlando la movilidad dependiente de flagelos.

El subgrupo de las *Pseudomonas* fluorescentes, se caracteriza por presentar un metabolismo muy versátil, que les permite colonizar y desarrollarse en distintos tipos de ecosistemas. Algunas especies establecen interacciones muy estrechas con las plantas, lo que implica en muchos casos que sean muy buenos colonizadores de la rizosfera. Existen numerosos factores que determinan que este proceso de colonización sea eficiente (Lugtenberg y Bloemberg, 2004), y entre ellos, la movilidad de la bacteria es uno de los más influyentes (de Weert y col., 2002; Capdevila y col., 2004). *P. fluorescens* F113 es capaz de asentarse en la rizosfera de muy diversos tipos de plantas (Dekkers y col., 2000; Naseby y Lynch, 1999; Simons y col., 1996; Villaceros, 2003; Villaceros y col., 2005), sin embargo, es una cepa que tiene muy reprimida su movilidad en condiciones de laboratorio. De hecho, mutantes más móviles o variantes fenotípicos aislados de la rizosfera, desplazan a la cepa silvestre en análisis de competitividad (Barahona y col., 2010, Barahona y col., 2011; Martínez-Granero y col., 2006). Por este motivo, se han identificado algunos genes que forman parte de rutas de regulación independientes y que controlan negativamente la movilidad en *P. fluorescens* F113, como el sistema de dos componentes GacA/GacS, *kinB*, *sadB* y el sistema Wsp. Por un lado, el sistema de dos componentes GacA/GacS y la proteína citoplasmática SadB, reprimen la movilidad a través de *fleQ* (Martínez-Granero y col., en preparación; Navazo

y col., 2009). Por otro lado, los genes *kinB* y *wspR*, inhiben el movimiento tipo *swimming* de la cepa silvestre, pero no lo hacen por medio del regulador principal de la síntesis flagelar FleQ.

En *P. aeruginosa*, KinB forma junto con AlgB un sistema de dos componentes implicado en la síntesis de alginato (Ma y col., 1997), y también participa en la regulación de la virulencia y la movilidad en esta bacteria (Chand y col., 2011). Un mutante *kinB* en *P. fluorescens* F113 se mueve más del doble que la cepa silvestre (Barahona y col., 2011), aunque no presenta mayores niveles de la proteína estructural mayoritaria del flagelo FliC. En este trabajo mostramos como la presencia de un segundo aparato flagelar críptico en F113, que presenta homología con el de *A. vinelandii* DJ, explica el fenotipo de hipermovilidad del mutante *kinB*, y que la ausencia de este flagelo, tanto en F113 como en el citado mutante, conlleva la pérdida de competitividad en la rizosfera.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento.

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 4.1. Todas las cepas de *Pseudomonas* se crecieron en medio de cultivo SA (Scher y Baker, 1982) a 28°C (Tabla 2.1), suplementado con MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O. Cuando se cultivaron en medio sólido, el SA se suplementó con 1.5% de agar purificado (Pronadisa). En los casos necesarios se hizo uso de antibióticos, que se utilizaron en las siguientes concentraciones (µg/mL): rifampicina (rif) 100; kanamicina (km) 50; gentamicina (gn) 3; espectomicina (spc) 100; tetraciclina (tc) 70.

*E.coli* y sus derivados se crecieron en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C (Tabla 2.1). En los cultivos en medio sólido, se añadió agar bacteriológico a una concentración final de 1.5%. Los antibióticos fueron usados en las siguientes concentraciones (µg/mL): kanamicina (km) 25; gentamicina (gn) 10; espectomicina (spc) 25; ampicilina (amp) 100; cloramfenicol (cm) 30; tetraciclina (tc) 10.

**Tabla 4.1:** Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.

	Características	Referencia
<b>Cepas bacterianas</b>		
DH5α	Cepa de clonaje de <i>E. coli</i>	Gibco-BRL
F113rif	<i>P. fluorescens</i> F113 Rif <sup>R</sup>	(Shanahan y col., 1992)
F113sadB-1	Mutante F113rif <i>sadB</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	(Navazo y col., 2009)
F113kinB	Mutante F113rif <i>kinB</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	(Barahona y col., 2011)
F113fleQ	Mutante F113rif <i>fleQ</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	(Capdevila y col., 2004)
F113fliC	Mutante F113rif <i>fliC</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	(Capdevila y col., 2004)
F113flgM	Mutante F113rif <i>flgM</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Este trabajo
F113algU	Mutante F113rif <i>algU</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Este trabajo
F113flhDC	Mutante F113rif <i>flhDC</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup>	Este trabajo
F113fliC2	Mutante F113rif <i>fliC2</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup>	Este trabajo
F113cyaA	Mutante F113rif <i>cyaA</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup>	Este trabajo
F113vfr	Mutante F113rif <i>vfr</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup>	Este trabajo
F113kinB-flhDC	Mutante F113rif <i>kinB</i> <sup>-</sup> y <i>flhDC</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup>	Este trabajo
F113kinB-fliC2	Mutante F113rif <i>kinB</i> <sup>-</sup> y <i>fliC2</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup>	Este trabajo
F113kinB-cyaA	Mutante F113rif <i>kinB</i> <sup>-</sup> y <i>cyaA</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup>	Este trabajo
F113kinB-vfr	Mutante F113rif <i>kinB</i> <sup>-</sup> y <i>vfr</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup>	Este trabajo
F113kinB-fleQ	Mutante F113rif <i>kinB</i> <sup>-</sup> y <i>fleQ</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup>	Este trabajo
F113kinB-flgM	Mutante F113rif <i>kinB</i> <sup>-</sup> y <i>flgM</i> <sup>-</sup> Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Gn <sup>R</sup>	Este trabajo
F113(pflhDC)	F113rif que contiene el plásmido pVLT31 con el gen <i>flhDC</i> clonado Rif <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
F113fliC(pflhDC)	Mutante F113fliC que contiene el plásmido pVLT31 con el gen <i>flhDC</i> clonado Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
F113fleQ(pflhDC)	Mutante F113fleQ que contiene el plásmido pVLT31 con el gen <i>flhDC</i> clonado Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
Variante fenotípico S	Variante fenotípico hipermóvil	(Sánchez-Contreras y col., 2002)
Variantes fenotípicos VS-23, VS-34, VS-86 y VS-99	Variantes fenotípicos hipermóviles aislados de la rizosfera tras inocular con F113 que sobreexpresaba Sss	(Martínez-Granero y col., 2006)
<b>Plásmidos</b>		
pGEM®T-easy vector	Vector de clonaje Amp <sup>R</sup>	Promega
pK18mobsacB	Vector suicida sacB Km <sup>R</sup>	(Schäfer y col., 1994)
pG18mob2	Vector suicida Gn <sup>R</sup>	(Kirchner y Tauch, 2003)
pRK600	Plásmido coadyuvante Cm <sup>R</sup>	(Finan y col., 1986)
pVLT31	Plásmido de expresión con promotor Ptac inducible por IPTG Tc <sup>R</sup>	(de Lorenzo y col., 1993)

### **Ensayos de movilidad tipo *swimming*.**

Los ensayos de movilidad tipo *swimming* se llevaron a cabo en medio SA al 0.3% de agar, solidificado en placas de 50 mm de diámetro (cada una de éstas contenía 12 mL de medio).

Las inoculaciones se realizaron individualmente y por cuadruplicado, a partir de cultivo sólido, el cual se recogía con un palillo dental estéril que posteriormente se introducía en el agar, sin llegar a contactar con el fondo de la placa. Las placas se incubaron a 28°C, efectuándose mediciones del diámetro del halo de movimiento 18, 24 y 42 horas después del momento de inoculación de la bacteria.

### **Construcción de mutantes simples y dobles. Ensayos de sobreexpresión.**

La construcción de mutantes se hizo por medio de mutagénesis dirigida. Para obtener los mutantes simples en los genes *flhDC*, *fliC2*, *cyaA* y *vfr*, se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 4.2) que amplificaron fragmentos internos de los genes de entre 300 y 500 nucleótidos. Estos pequeños fragmentos se clonaron en los vectores suicidas pK18*mobsacB* (Schäfer y col., 1994) o pG18*mob2* (Kirchner y Tauch, 2003) (Tabla 4.1). Estas construcciones se introdujeron en la cepa silvestre cuando se construyeron mutantes simples, o en el mutante *kinB* cuando se construyeron dobles mutantes, por medio de conjugaciones triparentales, usándose pRK600 como plásmido coadyuvante (Finan y col., 1996). Las conjugaciones se llevaron a cabo en medio LB, a 28°C durante 16 horas. Las colonias recombinantes fueron seleccionadas en placas de SA con los antibióticos correspondientes. Todos los mutantes fueron comprobados mediante *Southern-Blot* y PCR.

Para sobreexpresar el gen *flhDC* en F113 y derivados, se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 4.2) que permitieron la amplificación del gen completo. Este fragmento se clonó en el vector pVLT31 (de Lorenzo y col., 1993) (Tabla 4.1), que presenta un promotor tipo Ptac inducible por IPTG. La construcción se introdujo de nuevo en F113 y derivados mediante conjugación triparental.



**Tabla 4.2:** Oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Temperatura de anillamiento (°C)	Características
cyaA-F	GCTCTGGCAACTGTTCAAAGG	58	Para amplificar fragmento
cyaA-R	CTGTCCAGCAGCGCCAGTT	58	interno de 400 pb del gen <i>cyaA</i>
flhDC-F	AAAAGCCTGGTCACCGAAATG	58	Para amplificar fragmento
flhDC-R	CTTGATGACCGACCTGTTCCA	58	interno de 300 pb del gen <i>flhDC</i>
flhDC-F2	CCCAGTAAGGGAAAAGCGAAA	58	Para amplificar el gen entero
flhDC-R2	ACGCCTTGTGGTAAAGGGGTA	58	<i>flhDC</i> de 1100 pb
fliC2-F	CGTCCGGTCTGAAATCAACA	58	Para amplificar fragmento
fliC2-R	CGTAGCTGGTGTGGTCGAAG	58	interno de 500 pb del gen <i>fliC2</i>
vfr-F	TTCCGACACGTCGTTTTTCAT	58	Para amplificar fragmento
vfr-R	ATCGGGTTGCTTGACAGTT	58	interno de 400 pb del gen <i>vfr</i>

### Microscopía electrónica de transmisión.

Para estudiar la morfología, el número y la disposición de los flagelos en la cepa silvestre y sus derivados, utilizamos la microscopía electrónica de transmisión. Se prepararon cultivos líquidos de las cepas de interés, y se crecieron en medio LB hasta una  $DO_{600}$  de aproximadamente 0.8. A continuación se cogieron 40  $\mu$ l de cultivo (una gota) y se pusieron en *parafilm*. Con las pinzas, se depositó la rejilla, cubierta con Formvar, sobre la gota de cultivo durante 30 segundos. Las células adheridas a la rejilla se tiñeron con una gota de ácido fosfotúngico 1% durante 1 min y 15 segundos. Por último, la rejilla se lavó con gotas de agua estéril (3 veces durante 30 segundos). La visualización de las rejillas se realizó en el Laboratorio de Microscopía de Transmisión del Servicio Interdepartamental de Investigación de la UAM, donde se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM1010 (100 KV). La toma de fotografías se realizó con la cámara BioScan de Gatan y el sistema de análisis de imagen empleado fue DigitalMicrograph 3.1.

### Extracción, purificación y cuantificación de ARN.

Para la extracción de ARN, las cepas de interés se crecieron en 50 mL de LB hasta densidades ópticas que oscilaron entre 0.8 y 0.9. A continuación, los cultivos bacterianos se centrifugaron 5 min a 5000 rpm y a 4°C. El precipitado celular se resuspendió en 1mL de TRIzol (TRIzol® Reagent, Invitrogen) para lisar las células. Se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo y se agitaron los tubos vigorosamente, para después dejar reposar la mezcla 3 min. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 12000 rpm y a 4°C. Una vez centrifugadas, se recuperó en un nuevo tubo la fase acuosa superior, donde se queda retenido el ARN. La precipitación de ARN

se llevó a cabo a -20°C añadiendo 500 µL de isopropanol, durante 2-24 horas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 10 min a 12000 rpm y a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1mL de etanol 70%. De nuevo, se centrifugaron los tubos 5 min a 7500 rpm y a 4°C, se retiró el etanol y se dejaron secar 3 min a temperatura ambiente, para a continuación resuspender el precipitado en 30 µL de H<sub>2</sub>O miliQ estéril. Los valores de concentración de ARN obtenidos en el espectrofotómetro, oscilaron entre 0.8 y 2 µg/µL.

Después de la extracción, realizamos un tratamiento de eliminación de restos de ADN con el kit RQ1 RNase- Free DNase (Promega). Se trataron un total de 10 µg de ARN, a los que se añadieron 10 µL de DNase (1U/µL), 2.5 µL de RNase out (40U/µL, Invitrogen), 5 µL de *buffer* ADNsa (10X) y H<sub>2</sub>O hasta 50 µL. Las muestras se incubaron a 37°C durante 30 min. Una vez finalizado el tratamiento, el ARN obtenido se purificó utilizando de nuevo el protocolo del TRIzol. En el último paso se resuspendió en 10 µL de H<sub>2</sub>O miliQ estéril. En este caso, las concentraciones de ARN fueron de entre 0.5 y 0.9 µg/µL. Para asegurarnos de la eliminación del ADN, se realizaron PCRs del material, y para comprobar que el ARN no estaba degradado se corrieron las muestras en una electroforesis en gel de agarosa.

#### **Síntesis de ADNc y PCR cuantitativa (q-PCR).**

Para evitar la degradación de ARN extraído, se obtuvo el ADNc, utilizando para ello el kit SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen). En todos los casos, para la reacción de la RT (del inglés *Reverse Transcription*) se usó 1 µg de ARN y a continuación se siguieron las instrucciones del fabricante, tanto para la preparación como para el programa del termociclador.

Una vez sintetizado el ADNc, se procedió al análisis de expresión de genes mediante q-PCR. El termociclador utilizado fue Quantica Techne-Barloworld Scientific. Para el ensayo se usó el kit Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Los niveles de expresión de los genes *flhDC* y *fliC2* se midieron en los diferentes fondos genéticos de nuestro estudio y se normalizó utilizando el ARN 16S como control interno, utilizando el siguiente programa: 95°C-10 min; (95°C- 15 seg; 56°C- 30 seg; 72°C-30 seg) x35 ciclos. En todos los casos, se realizó un último paso de curva de disociación para asegurarse que la amplificación era específica y única.

### **Extracción de proteínas y *Western blot*.**

Para la extracción de proteínas, las cepas bacterianas se crecieron en 200 mL de LB hasta una  $DO_{600}$  de aproximadamente 0.8. A continuación, los cultivos se agitaron vigorosamente mediante vortex durante 2 min, para conseguir así el desprendimiento del flagelo de la bacteria. Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 15 min a 7500 rpm y a 4°C y las proteínas extracelulares se extrajeron del sobrenadante mediante precipitación: 10 min a temperatura ambiente con ácido desoxicolico (DOC) (10% (p/v)) y posteriormente, 2 horas a 4°C con ácido tricloroacético (TCA) (10% (p/v)). Tras el paso de precipitación, se realizaron dos lavados mediante resuspensión del precipitado con acetona fría 80% y posterior centrifugación durante 20 min a 4°C y 12000 rpm. Por último, las muestras se resuspendieron en 100 µL de PBS y se almacenaron a -80°C.

Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Micro-Bradford (Bio-rad Protein Assay) (Bradford, 1976). Los valores obtenidos oscilaron entre 4 y 6 µg/µL. Previo a la separación de las muestras por electroforesis, se solubilizaron con tampón Laemmli 2X (Laemmli, 1970), el cual se añadió en relación 1:1. Posteriormente, se procedió a hervir las muestras durante 10 min y se centrifugaron 1 min a 14500 rpm para recuperar el sobrenadante.

Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacridamida, con un porcentaje del 4% (p/v) en el gel de concentración y del 12% (p/v) en el gel de separación. La cantidad de proteínas cargada en el gel fue de entre 25 y 30 µg. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 100V.

Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante la técnica de *Western blot*. Las condiciones para la transferencia fueron 100V, 1 hora a 4°C. La membrana con las proteínas se lavó con TBS (Tris-HCl, 50 mM; NaCl 20 mM) durante 10 min para luego bloquearla 30 min con leche en polvo desnatada (seroalbúmina bovina) al 2% (p/v) en TBS. Posteriormente se procedió a la incubación de la membrana con una dilución 1:10000 del antisuero anti-flagelina (de Weger y col., 1987) en TBS con leche en polvo desnatada al 2% (p/v) durante 16 horas a 4°C. Posteriormente, se realizaron varios lavados con TBS y se incubó con una dilución 1:10000 del anticuerpo secundario αIgG-conejo conjugado con peroxidasa de rábano en TBS con leche en polvo desnatada al 2% (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. El revelado de la inmunodetección se llevó a cabo por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL™ Western Blotting Systems GE Healthcare (Amersham, Life Science).

### **Ensayos de colonización competitiva de la rizosfera.**

La esterilización de semillas de alfalfa (*Medicago sativa* variedad Aragón) se realizó mediante dos tratamientos, uno con etanol 70% durante 2 min., y otro con lejía diluida (1:5) 15 min., ambos en agitación suave. El exceso de lejía se retiró mediante sucesivos lavados con H<sub>2</sub>O destilada estéril. A continuación se depositaron en placas de agar al 1% (aproximadamente 40 semillas por placa) y se incubaron a 4°C en oscuridad durante 16 horas. Posteriormente se procedió a la germinación de las semillas, durante 24 horas a una temperatura de 28°C, también en oscuridad.

El sustrato sólido utilizado fue perlita, que se autoclavó junto con las macetas riviara, previamente humedecido con medio FP (Fahraeus, 1957) (Tabla 2.2) suplementado con KNO<sub>3</sub> 8 mM como solución mineral. Una vez esterilizado el sustrato, las semillas germinadas fueron trasplantadas a las macetas riviara. Cada ensayo de colonización competitiva se hizo por triplicado (3 macetas con 20 plantas cada una).

Transcurridos dos días, se inoculó cada planta de alfalfa en la base del tallo con 1 mL de una mezcla 1:1 de las cepas a competir a una DO<sub>600</sub> de 0.0138 (10<sup>8</sup> bacterias) crecidas previamente en medio SA durante 18 horas. Las plantas de alfalfa se regaron a lo largo de 2 semanas cada 2 días con medio FP y las condiciones de crecimiento para éstas fueron las siguientes: 16 horas de luz a 25°C y 8 horas en oscuridad a 18°C.

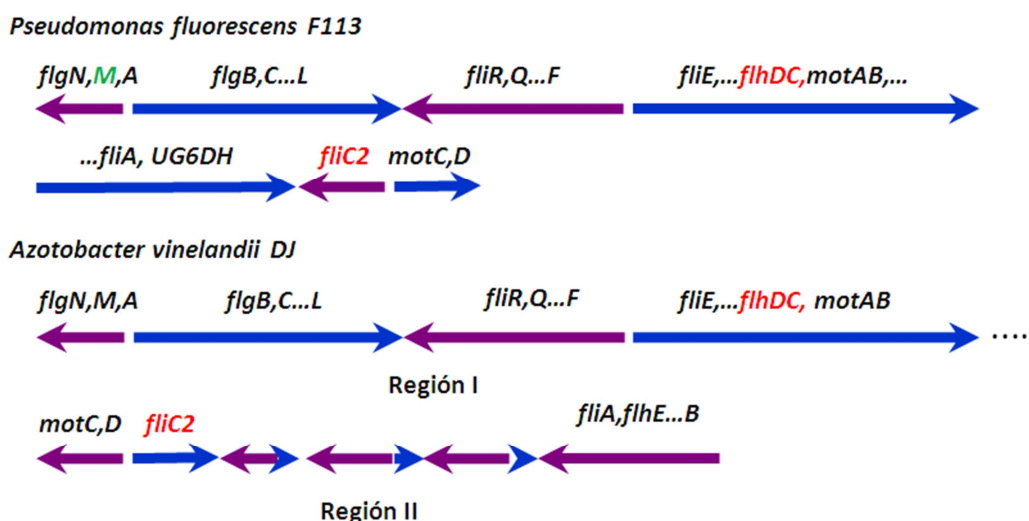
Tras 2 semanas desde el momento de la inoculación, se procedió a la extracción de las plantas del sustrato, y tras seccionar el último centímetro de la raíz principal (zona del ápice) y obtener el peso en gramos de todos los ápices de las plantas de una misma maceta riviara, se obtuvieron las bacterias mediante agitación por vortex. Se sembraron en placas con antibióticos las diluciones seriadas, realizándose el recuento de colonias a las 48 horas.

## **RESULTADOS**

### **El genoma de *P. fluorescens* F113 codifica un segundo aparato flagelar.**

El análisis del anteproyecto del genoma de *P. fluorescens* F113 muestra, que además de la presencia de los genes necesarios para la síntesis y ensamblaje del flagelo típico de *Pseudomonas*, existe una isla genética de 41kb con 40 ORFs, que contiene genes que presentan homología con otros genes flagelares (Fig. 4.1). Esta región contiene el operón *flhDC*, que codifica dos proteínas que constituyen el máster regulador de la síntesis flagelar en

otras  $\gamma$ -proteobacterias, como es el caso de las Enterobacterias y *Azotobacter*. Concretamente, los 40 ORFs muestran una gran homología y sintenia con los genes flagelares de *A. vinelandii*, una bacteria de suelo altamente relacionada con el género *Pseudomonas* (Fig. 4.1). Es interesante destacar que *A. vinelandii* produce un tipo de flagelo diferente, ya que presenta flagelación peritrica, en vez de lo que ocurre con *Pseudomonas*, dónde lo normal es encontrar uno o dos flagelos en posición polar.



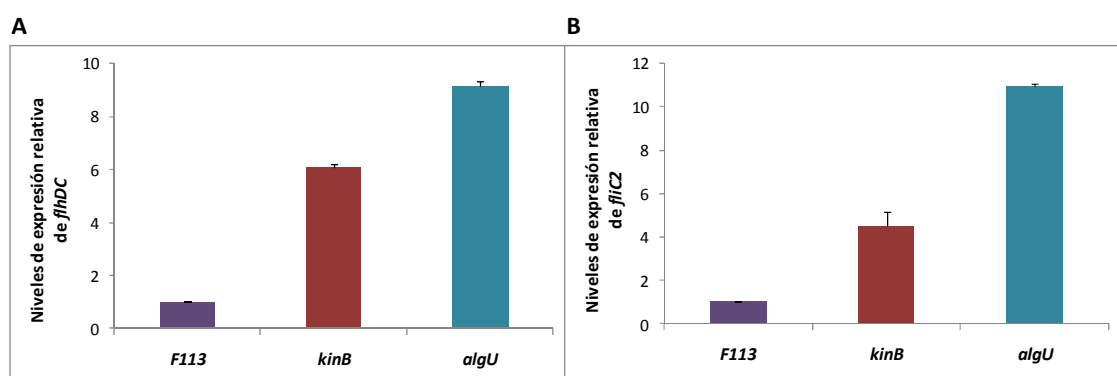
**Fig. 4.1:** Representación esquemática de las regiones flagelares de *P. fluorescens* F113 y *A. vinelandii*. En la isla genética de 41 kb de *P. fluorescens* F113, los genes correspondientes a las regiones I y II de *A. vinelandii* se sitúan de forma adyacente. Las diferencias entre ambas cepas radican en la región II. Si comparamos ambos esquemas se puede observar como falta la parte central de la región II de *A. vinelandii* en F113. Pero además, los genes que no se han perdido, están invertidos con respecto al genoma de *A. vinelandii*. En rojo se destaca la posición del máster regulador *flhDC* y de *fliC2* en las dos cepas. En verde se señala la localización de *flgM*, que en F113, está mutado.

En el cromosoma de *A. vinelandii*, los genes flagelares se localizan en dos regiones distintas, denominadas I y II, separadas entre sí por 408kb. Los genes que forman parte de la primera están localizados exactamente en el mismo orden que en la región cromosómica de 41kb de F113. Con la región II no ocurre lo mismo, ya que lo que se observa en el genoma de F113 es una versión reducida de la segunda región de *A. vinelandii*, debido a que falta la parte central, y el resto de secuencia además de estar invertida, es adyacente a la región I. Todos los genes que están presentes en el cromosoma de *A. vinelandii*, pero no lo están en el de F113, codifican proteínas que no son esenciales para la síntesis y ensamblaje del flagelo. Por otro lado, cabe destacar que en el genoma de F113, uno de los genes que está situado en la primera región, el gen *flgM*, que codifica un factor anti-sigma esencial para la biogénesis flagelar, presenta una mutación que da lugar a un cambio en el marco de lectura (Fig. 4.1).

**Los genes que sintetizan el segundo flagelo no se expresan en *P. fluorescens* F113, pero sí se expresan en un mutante *kinB*.**

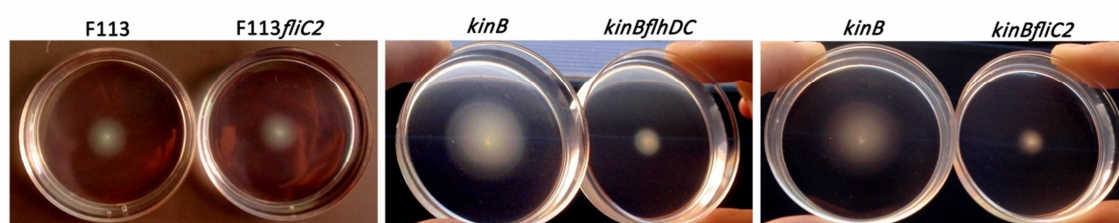
Con el fin de conocer la funcionalidad de este segundo aparato flagelar, se estudió la expresión del operón *flhDC* y del gen *fliC2* (que codifica la flagelina del segundo flagelo) en la cepa silvestre. Se realizaron ensayos de expresión mediante RT-PCR, y los resultados mostraron que no existe expresión de ninguno de estos genes, ni en fase exponencial ni estacionaria, y tampoco se observó expresión en diferentes medios de cultivo. Este resultado sugiere que *P. fluorescens* F113 no produce el segundo aparato flagelar en las condiciones con las que trabajamos en el laboratorio. Sin embargo, un mutante *kinB*, que fue anteriormente seleccionado como cepa hipermóvil en ensayos de mutagénesis por transposición al azar (Navazo y col., 2009), muestra una expresión significativa, tanto del operón *flhDC*, como del gen *fliC2* (Fig. 4.2A y B). León y Espín (2008) mostraron como en *A. vinelandii* el operón *flhDC* está regulado negativamente por el gen *algU*, el cual codifica un factor sigma necesario para la activación de *kinB* en *Pseudomonas* (Damron y col., 2009). Por este motivo, también hemos estudiado la expresión de *flhDC* y *fliC2* en una cepa de F113 portadora de una mutación en *algU* (Fig 4.2A y B).

Concretamente, los resultados obtenidos mostraron que la expresión de *flhDC* era 6 veces superior en el mutante *kinB* y 8 veces superior en el caso del mutante *algU*, con respecto a la cepa silvestre. Del mismo modo, la expresión de *fliC2* también fue superior en el mutante *kinB* (4.5 veces) y en el mutante *algU* (11 veces) (Fig 4.2A y B), en comparación con F113.



**Fig. 4.2:** Análisis mediante PCR cuantitativa de los niveles de expresión de *flhDC* y *fliC2* en F113 y derivados. **A.** Niveles de expresión del máster regulador *flhDC* en la cepa silvestre y en los mutantes *kinB* y *algU*. En ambos mutantes hay mayor expresión que en la cepa silvestre. **B.** Niveles de expresión del gen *fliC2*, que codifica para la principal proteína estructural del flagelo, en la cepa silvestre y en los mutantes *kinB* y *algU*. En ambos mutantes hay mayor expresión que en la cepa silvestre.

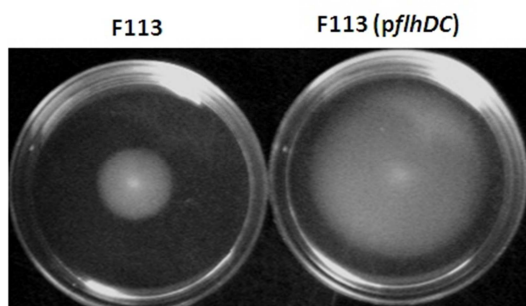
Con el fin de conocer si el fenotipo de hipermovilidad del mutante *kinB* era debido a la producción de este segundo aparato flagelar, se construyeron dobles mutantes *kinBflhDC* y *kinBfliC2*. Como se muestra en la figura 4.3, ambas mutaciones suprimen el fenotipo hipermóvil del mutante *kinB*, restaurándose así la movilidad de la cepa silvestre. Por tanto, estos resultados nos indican que el fenotipo del mutante *kinB* es consecuencia de la producción de este segundo flagelo. En la fig. 4.3, también se puede observar que el mutante *fliC2* presenta la misma movilidad que la cepa silvestre (10.8 mm  $\pm$ 0.6 y 11.5 mm  $\pm$ 0.6, respectivamente). Este resultado concuerda con el hecho de que F113 no expresa el segundo sistema flagelar en las condiciones de laboratorio.



**Fig. 4.3:** Movilidad tipo *swimming*. Halos de movilidad a las 18 horas desde la inoculación de las cepas. Se puede observar como el mutante *fliC2* presenta prácticamente la misma movilidad que la cepa silvestre (10.8 mm  $\pm$ 0.6 y 11.5 mm  $\pm$ 0.6, respectivamente). El mutante *kinB* presenta un aumento de la movilidad tipo *swimming* (18.5 mm  $\pm$ 0.6) con respecto a F113. Los dobles mutantes *kinBflhDC* y *kinBfliC2* tienen una movilidad similar a la de la cepa silvestre (12.25 mm  $\pm$ 0.5 y 11 mm  $\pm$ 0, respectivamente).

#### La expresión ectópica de *flhDC* incrementa la movilidad en *P. fluorescens* F113.

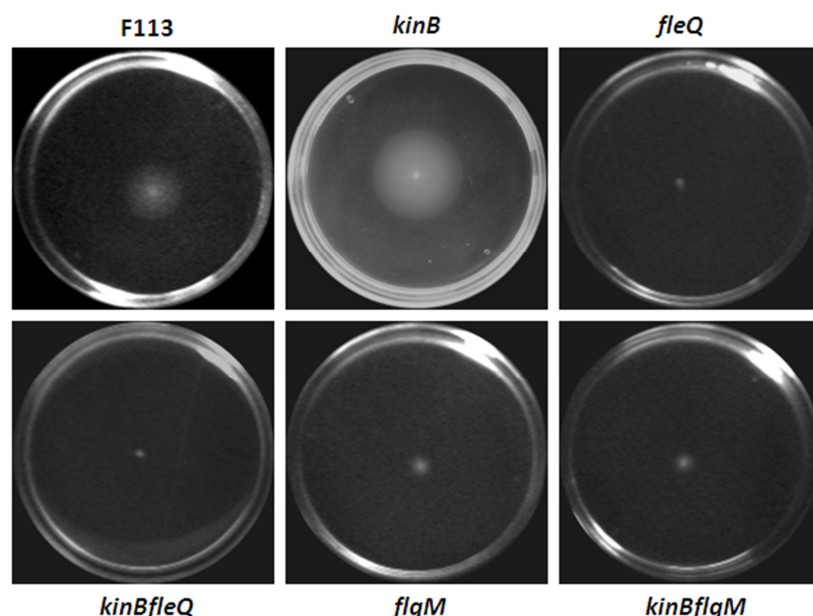
Para expresar los genes *flhDC* en F113, el operón fue clonado en el plásmido pVLT31 (de Lorenzo y col., 1993), bajo el control de un promotor inducible tipo Ptac. El plásmido recombinante se introdujo en la cepa silvestre, dando como resultado un aumento de su movilidad (Fig. 4.4). Este experimento demuestra que la expresión del operón regulador principal es suficiente para poner en marcha toda la cascada de regulación responsable de la formación del segundo aparato flagelar. No obstante, la introducción del plásmido en mutantes inmóviles como *fliC* o *fleQ*, no produjo el mismo resultado (resultados no mostrados), ya que en estos casos no se restauraba la movilidad, indicando que la formación del primer flagelo podría ser necesaria para que se sintetice el segundo.



**Fig. 4.4:** Movilidad tipo *swimming*. Se muestran los halos de movilidad producidos por F113 y F113 sobreexpresando el máster regulador del segundo flagelo (F113(*pflhDC*)). A las 42 horas, la media de las 4 medidas del diámetro del halo de F113 fue de 10 mm ( $\pm 0$ ) y la media de las 4 medidas del diámetro del halo de F113(*pflhDC*) fue de 22 mm ( $\pm 0.5$ ).

FleQ es el regulador principal del primer flagelo, por lo que la alteración del gen que lo codifica deriva en una cepa inmóvil sin flagelo polar (Capdevila y col., 2004). Al igual que un mutante sencillo en el gen *fleQ*, el doble mutante *kinBfleQ* es inmóvil (Fig. 4.5). Este resultado indica que es necesaria la existencia del primer flagelo para que pueda formarse y ensamblarse el segundo aparato flagelar. Como se ha apuntado anteriormente, el gen *flgM2* perteneciente a la secuencia del segundo aparato flagelar, presenta una mutación que genera un cambio en el marco de lectura. Así, nos planteamos que F113 probablemente utilice el gen *flgM* del primer flagelo. Quizá la secreción de FlgM sea necesaria para que el gen *fliA2* del segundo flagelo pueda estar activo. Para comprobar esta hipótesis, generamos mutaciones en *flgM*, tanto en la cepa silvestre como en un mutante *kinB*. El mutante *flgM* resultó ser una cepa inmóvil (Fig. 4.5), incluso cuando se expresaba *pflhDC* de forma ectópica (resultado no mostrado). Además, el doble mutante *kinBflgM* era incapaz de moverse (Fig. 4.5), lo que nos indica que efectivamente, la expresión de *flgM* es necesaria para que tenga lugar la biosíntesis del segundo flagelo.

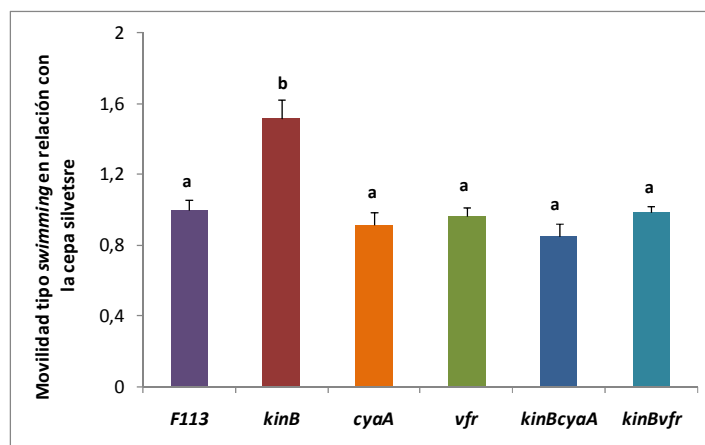




**Fig. 4.5:** Movilidad tipo *swimming*. En la imagen aparecen los halos de movilidad producidos por F113 y derivados. Las medidas e imágenes fueron tomadas a las 18 horas desde la inoculación de las cepas. El diámetro del halo de movilidad de F113 fue de 10.8 mm  $\pm$  0.6. El mutante *kinB* produjo un halo de movilidad superior al de F113, con un diámetro de 18.5 mm  $\pm$  0.6. El resto de mutantes simples, resultaron inmóviles, como estaba descrito. Los dobles mutantes *kinBfleQ* y *kinBflgM* tampoco presentaron movilidad.

#### Vfr regula positivamente a *flhDC*

Como en *A. vinelandii*, el complejo AMPc-Vfr es el responsable de la activación del operón *flhDC*, decidimos analizar si en *P. fluorescens* F113 la proteína Vfr también estaba implicada en la regulación del segundo aparato flagelar. Se construyó un mutante en el gen *vfr* y doble mutante *kinBvfr* para poder analizar su movilidad tipo *swimming*. En la figura 4.6, se observa que el mutante *vfr* no tiene afectada la movilidad, sin embargo, la alteración de *vfr* en el mutante *kinB*, suprime claramente el fenotipo hipermóvil, restaurándose así los niveles de movilidad de la cepa silvestre. Al mismo tiempo estudiamos el efecto que suponía la mutación en el gen *cyaA*, que codifica una adenilato ciclasa necesaria para la formación del flagelo en Enterobacterias, tanto en F113 como en el mutante *kinB*. El mutante *cyaA* no presentaba afectada su capacidad de movimiento (Fig. 4.6), corroborando el hecho de que F113 no expresa el segundo flagelo. En el caso del doble mutante *kinBcyaA*, observamos que otra vez se revierte el fenotipo de movimiento recuperándose los niveles de la cepa silvestre (Fig. 4.6).

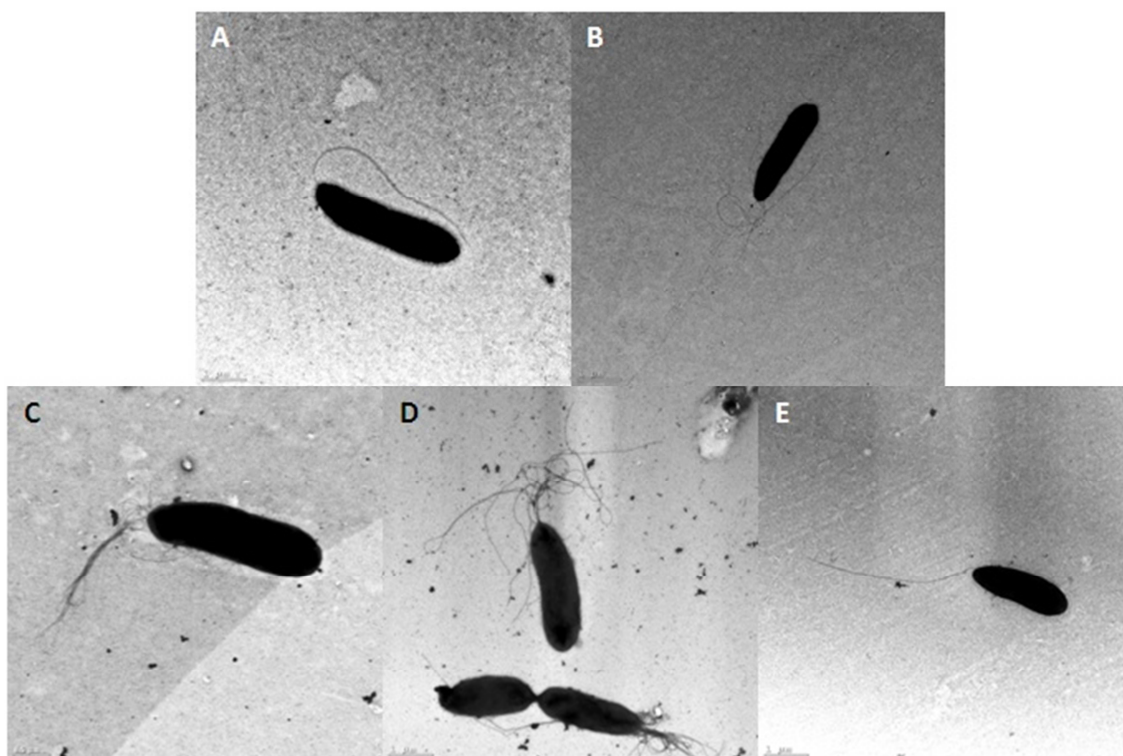


**Fig. 4.6:** Movilidad tipo *swimming* en relación con la cepa silvestre. F113 y los mutantes a ensayar fueron inoculados con un palillo dental en el centro de una placa de 12 mm de diámetro que contenía medio SA suplementado con 0.3% de agar purificado. Cada cepa se ensayó por cuadruplicado, y se hicieron medias de las medidas tomadas a las 18 horas de incubación a 28°C. El único mutante que presentó diferencias significativas de movilidad con respecto a la cepa silvestre fue *kinB* ( $p < 0.05$ ).

En conjunto todos estos datos nos indican, por un lado, que *vfr* controla la síntesis del segundo flagelo de manera dependiente de AMPc, y por otro, que *kinB* reprime fuertemente la producción del segundo aparato flagelar en *P. fluorescens* F113.

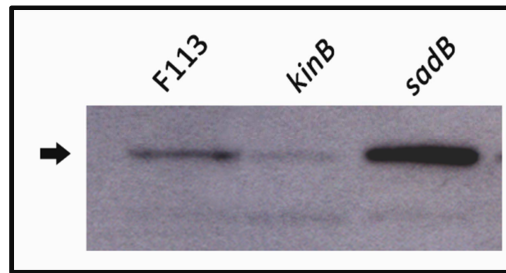
#### **La producción del segundo aparato flagelar genera células bacterianas con hiperflagelación polar.**

Para determinar el número y la localización de los flagelos en diferentes derivados de F113, se empleó la tinción negativa para poder visualizar así las células bacterianas usando microscopía electrónica de transmisión (Fig. 4.7). Como anteriormente se había descrito, observamos la existencia de uno o dos flagelos en posición polar en la cepa silvestre. Por el contrario, todas las cepas que producen el segundo flagelo, como es el caso del mutante *kinB* o de F113(*pflhDC*), presentaron un penacho de flagelos en uno de los polos celulares. Estos mismos resultados se observaron en el variante fenotípico S, que es un mutante espontáneo hipermóvil aislado de la rizosfera (Sánchez-Contreras y col., 2002). Sin embargo, el mutante *kinB* portador de la mutación en el gen de la segunda flagelina *fliC2*, muestra el mismo patrón de flagelación que la cepa silvestre.



**Fig. 4.7:** Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de F113 y derivados. **A.** *P. fluorescens* F113 cepa silvestre, con un solo flagelo en posición polar. **B.** F113(*pflhDC*) con más de un flagelo y más largos que F113, en posición polar. **C.** Mutante *kinB*, que expresa el segundo aparato flagelar, con largos y numerosos flagelos en uno de los polos. **D.** Variante fenotípico S, con un fenotipo muy similar al mutante *kinB*. **E.** Doble mutante *kinBfliC2*, con un único flagelo en un polo celular, al igual que en la cepa silvestre.

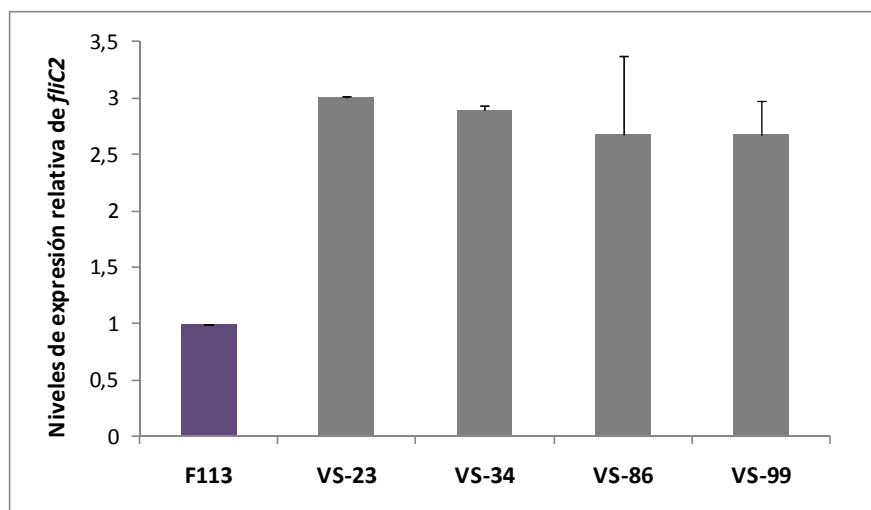
Para confirmar que este fenómeno de hiperflagelación era consecuencia de la producción del segundo aparato flagelar y no por sobreproducción del primer flagelo, se procedió a la extracción de proteínas extracelulares de cultivos de la cepa silvestre, el mutante *kinB* y el mutante *sadB*, el cual sabemos que sobreexpresa la flagelina FliC (Navazo y col., 2009). En figura la 4.8 se muestra el resultado de un *Western blot* en el que se utilizó un anticuerpo que reconoce FliC, pero no la segunda flagelina FliC2. Se puede observar que únicamente hay sobreproducción de FliC en el mutante *sadB*.



**Fig. 4.8:** *Western blot* para la detección de la flagelina. Se analizaron los niveles de *FliC* en la cepa silvestre, y en los mutantes hipermóviles *kinB* y *sadB*. La flecha indica la banda correspondiente a la flagelina con un peso molecular de aproximadamente 37.5 KDa. El mutante *sadB* presenta altos niveles de esta proteína flagelar con respecto F113, sin embargo, el mutante *kinB*, aunque presenta incrementada la movilidad tipo *swimming*, tiene cantidades de *FliC* similares a F113, por lo que su hipermovilidad no es debida a la sobreproducción de la flagelina del primer flagelo.

### La producción del segundo aparato flagelar es importante para la colonización de la rizosfera.

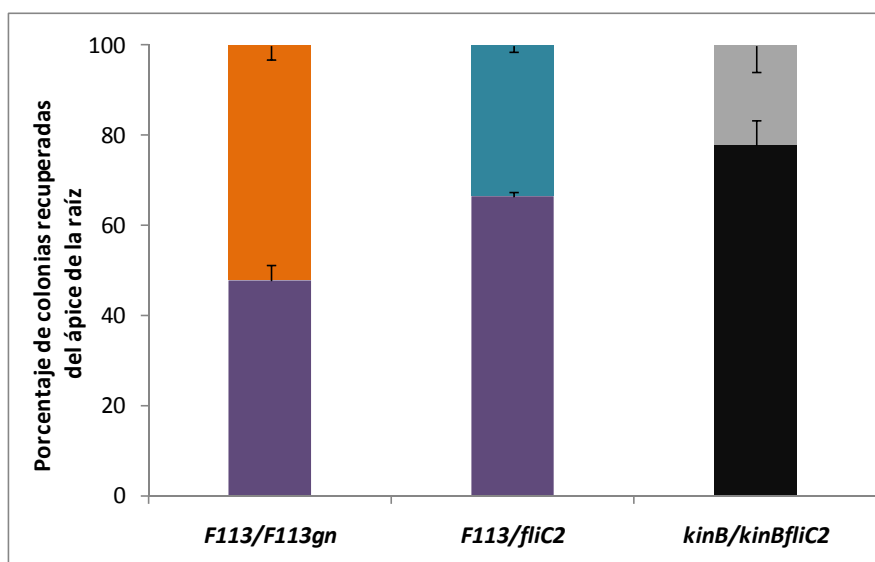
Debido a que parecía que el variante fenotípico S estaba sintetizando el segundo flagelo (Fig. 4.7D), decidimos analizar la expresión de *fliC2* en toda una batería de variantes fenotípicos hipermóviles aislados de la rizosfera de alfalfa (Martínez-Granero y col., 2006) (Tabla 4.1). Todos estos mutantes naturales expresaron el gen que codifica la segunda flagelina (Fig. 4.9), sugiriendo la existencia de una presión selectiva para la producción del segundo aparato flagelar en el ambiente rizosférico.



**Fig. 4.9:** Análisis mediante PCR cuantitativa de los niveles de expresión de *fliC2* en F113 y 4 variantes fenotípicas aislados de la rizosfera tras inocular con una cepa que sobreexpresaba la recombinasa específica de sitio Sss. Todos estos mutantes naturales expresaron la segunda flagelina.

A raíz de estos resultados, se realizaron estudios de colonización competitiva de la rizosfera, para corroborar la importancia de este segundo flagelo en este proceso.

Los ensayos se llevaron a cabo utilizando plantas de alfalfa inoculadas con la cepa en estudio y la competidora en proporciones 1:1. Por un lado, se analizó la capacidad de colonizar la rizosfera de F113 y el mutante *fliC2*, incapaz de producir la segunda flagelina. La cepa silvestre desplazó del último centímetro de la raíz al mutante *fliC2* (Fig. 4.10). Por otro lado, se determinó la capacidad de colonización competitiva de un mutante *kinB*, que produce el segundo flagelo, frente a un doble mutante *kinBflic2*, que es incapaz de producirlo. En la gráfica (Fig. 4.10) se observa claramente como el mutante *kinB*, que sintetiza ambos flagelos, desplaza de forma drástica a *kinBflic2*, que sólo produce el primer flagelo. Este hecho confirma la necesidad de este segundo aparato flagelar para que la colonización de la rizosfera sea más eficiente.



**Fig. 4.10:** Colonización competitiva de la rizosfera de alfalfa por F113, el mutante *fliC2*, el mutante *kinB* y el doble mutante *kinBflic2*. Las plantas se inocularon con las cepas (cepas a estudiar y F113) en proporciones 1:1. Después de 2 semanas, se recuperaron las bacterias del ápice de la raíz principal de cada planta y se llevó a cabo el recuento de bacterias. Las barras moradas corresponden al porcentaje de colonias de F113 recuperadas del ápice. La barra naranja muestra el porcentaje de colonias de F113 marcada con gentamicina recuperadas del ápice (control de competición con la cepa silvestre marcada). La barra azul corresponde al porcentaje de colonias del mutante *fliC2* recuperadas del ápice. De F113 se recupera un 66.3%, mientras que del mutante *fliC2* desplazado, un 33.7%. La barra negra corresponde al porcentaje de colonias recuperadas del mutante *kinB* (77.7%) y la barra gris muestra el porcentaje de colonias del doble mutante *kinBflic2* aisladas del ápice (22.3%).

## DISCUSIÓN

*P. fluorescens* F113 es una bacteria aislada de la rizosfera de remolacha (*Beta vulgaris*) (Shanahan y col., 1992), y se ha descrito como una excelente colonizadora de la raíz de varias plantas de interés para el hombre (Dekkers y col., 2000; Naseby y Lynch, 1999; Simons y col., 1996; Villaciers, 2003; Villaciers y col., 2005). Además, *P. fluorescens* F113 es una cepa idónea para ser empleada como agente de control biológico, ya que sintetiza DAPG (2,4-Diacetilfloroglucinol), que es un metabolito secundario capaz de atenuar la acción de hongos fitopatógenos. Para que una bacteria pueda ser aplicada como agente de biocontrol ha de colonizar de manera eficiente la rizosfera de las plantas. Se sabe que de entre todos los factores implicados en la colonización rizosférica, la movilidad bacteriana es uno de los caracteres más importantes (de Weert y col., 2002; Capdevila y col., 2004). En lo que respecta a *P. fluorescens* F113, se han realizado grandes avances que han permitido conocer rutas de señalización que regulan la movilidad de la bacteria. Concretamente, en el trabajo de Navazo y col. (2009) se describen tres de estas vías que están controlando la movilidad tipo *swimming* y *swarming* de forma independiente. La primera, es la definida por el sistema de dos componentes *gacA/gacS*, que controla la síntesis de metabolitos secundarios y exoenzimas responsables de la capacidad de biocontrol o de la virulencia en *Pseudomonas* (Aarons y col., 2000; Gaffney y col., 1994; Haas y Keel, 2003; Heeb y Haas, 2001; Tomenius y col., 2006). Este sistema también regula la movilidad en muchas especies bacterianas (Chatterjee y col., 2003; Heurleir y col., 2004; Kay y col., 2005; Quiñones y col., 2005). En *P. fluorescens* F113 y *P. brassicacearum* NFM421 (Achouak y col., 2004), el sistema Gac controla de forma negativa la movilidad, y en concreto, en F113 los mutantes *gac* presentan una movimiento tipo *swimming* 1.5 veces mayor que la cepa silvestre (Martínez- Granero y col., 2006). En segundo lugar, está la vía definida por la proteína citoplasmática SadB, descrita con anterioridad como implicada en los primeros pasos de la adhesión inicial en los procesos de formación de biopelículas (Caizza y O'Toole, 2004). La alteración de *sadB* en F113 da lugar a cepas que presentan incrementado el *swimming* y el *swarming* en comparación con la cepa original. Y por último, se describe la ruta controlada por el sistema Wsp, el cual presenta homología con el sistema Che de quimiotaxis de *E.coli*. Este sistema responde a señales externas desconocidas, transducidas a continuación a través de WspR que sintetiza di-GMPc (Hickman y col., 2005). Del mismo modo, mutantes *wspR* en *P. fluorescens* F113 tienen aumentada la movilidad tipo *swimming* y *swarming*. Estas tres vías actúan de manera independiente regulando el movimiento relacionado con el flagelo típico de *Pseudomonas*.

Por otro lado, la secuenciación del genoma de *P. fluorescens* F113, ha revelado la existencia de una región cromosómica de 41 kb no presente en otras *Pseudomonas*, que contiene genes flagelares con alta homología con los de *A. vinelandii* DJ. Esta bacteria Gram negativa fijadora de nitrógeno, es muy cercana a bacterias del género *Pseudomonas* (Rediers y col., 2004), cuya movilidad depende de flagelos peritricos. Recientemente se han identificado las tres regiones que contienen los genes responsables de la biogénesis del aparato flagelar en el genoma de esta cepa de *A. vinelandii* (León y Espín, 2008). En la figura 4.1, se representa la región I y II, separadas entre sí por 408 kb, donde se observa una clara sintenia con la nueva isla genética localizada en F113. Con respecto a la región I, se detecta una idéntica disposición génica y se localizan genes del motor flagelar, el gen *flgM* o el máster regulador principal *flhDC*, entre otros. Sin embargo, comparando la región II, se observa que, por un lado, hay pérdida de genes no esenciales para sintetizar el segundo flagelo, y por otro, existe una inversión, ya que *fliC2* cambia su orientación en el genoma de F113. Estos resultados nos sugieren un posible mecanismo de transferencia horizontal de genes entre ambas especies. No es la primera vez que se pone de manifiesto que el fenómeno de transferencia horizontal es el responsable de la donación de paquetes de genes flagelares. *Rhodobacter sphaeroides* ( $\alpha$ -Proteobacteria) contiene dos grupos de genes que sintetizan para dos flagelos distintos, y los análisis filogenéticos sugieren que uno ellos fue adquirido por donación de alguna  $\gamma$ -Proteobacteria (Poggio y col., 2007).

No obstante, parece ser que los genes que configuran esta isla genética no se están expresando en *P. fluorescens* F113 en condiciones de laboratorio (Fig. 4.2), indicando que este nuevo aparato flagelar es críptico en F113. Cuando analizamos la expresión del máster regulador principal *flhDC* y de *fliC2* en mutantes hipermóviles construidos en el laboratorio, observamos que dos de ellos, *kinB* y *algU*, si expresaban estos genes (Fig. 4.2). Estos resultados concuerdan con lo descrito en *A. vinelandii*, ya que León y Espín (2008) proponen un modelo de control de la movilidad mediado por AlgU. El factor sigma AlgU o  $\sigma^{22}$ , controla la expresión de genes implicados en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* (Gaona y col., 2004), pero de forma inversa, este factor también regula la movilidad; hecho descrito anteriormente en variantes mucosos de *P. aeruginosa* (Tart y col., 2005; Tart y col., 2006). En *P. fluorescens* F113, AlgU controla positivamente la expresión de KinB, que junto con AlgB, forman un sistema de dos componentes que interviene en la síntesis de exopolisacárido. Al mismo tiempo, el sistema de dos componentes GacA/GacS, a través AlgU, activa a AmrZ que a su vez bloquea la transcripción de regulador principal del flagelo FleQ (Martínez-Granero y col., en preparación). Por este motivo pensamos que AlgU, a través de KinB, podrían estar reprimiendo también la

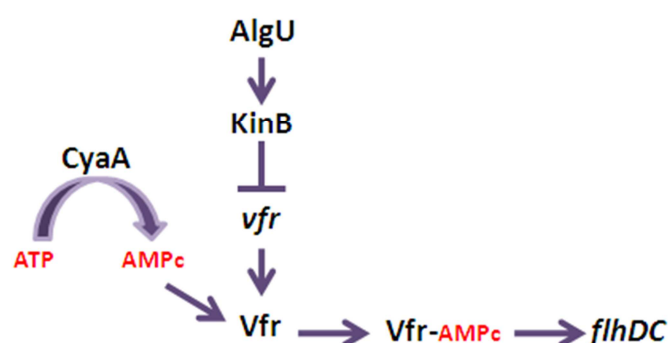
expresión del regulador principal del segundo flagelo *flhDC*. Los datos de movilidad tipo *swimming* de los mutantes *flhDC* y *fliC2*, y de los dobles mutantes *kinBflhDC* y *kinBfliC2*, confirman este hecho. La alteración de *fliC2* en F113 no supone variaciones significativas en la movilidad con respecto a la cepa silvestre (Fig. 4.3), lo que de nuevo demuestra que el segundo flagelo no se está expresando en F113 en este tipo de experimentos. Estos resultados confirman que *kinB* actúa en la regulación del segundo aparato flagelar, ya que los dobles mutantes *kinBflhDC* y *kinBfliC2* se mueven de forma similar a la cepa silvestre, indicando que se está suprimiendo todo el fenotipo de movilidad debido al segundo flagelo.

Los ensayos de sobreexpresión del regulador *flhDC* nos indicaron dos cosas importantes. Por una parte, que la expresión ectópica de *flhDC* en F113 era suficiente para aumentar la movilidad significativamente (Fig. 4.4), por lo que se estaba produciendo el segundo aparato flagelar; y por otra, que era necesaria la existencia del primer flagelo para que pudiera sintetizarse y ensamblarse el segundo, ya que la sobreexpresión de *flhDC* en mutantes carentes del primer flagelo no derivó en un incremento en la movilidad. Este hecho podía deberse a la mutación que presenta el gen *flgM* del segundo flagelo (Fig. 4.1). En Enterobacterias, FlgM es un factor anti-sigma que regula a FliA ( $\sigma^{28}$ ) (Chadsey y col., 1998), y este último es un activador de los genes flagelares de clase III. Si FlgM está acoplado con FliA, no hay transcripción de los genes de clase III, pero cuando FliA queda libre porque FlgM es secretado a través del flagelo en formación, finaliza la síntesis flagelar (Hughes y col., 1993). Este tipo de regulación también se ha descrito en *P. aeruginosa* (Dasgupta y col., 2003). El hecho de que FlgM correspondiente al primer flagelo sea necesario para la síntesis del segundo, parece confirmado mediante la construcción del doble mutante *kinBflgM* que al igual que el mutante *flgM*, es una cepa inmóvil (Fig. 4.5).

En Enterobacterias como *E. coli* y *S. typhimurium*, se conoce bastante bien la organización, síntesis y autoensamblaje del flagelo, así como el papel que juega el segundo mensajero AMPc en su regulación (Adler y Templeton; 1967; Komeda y col., 1975; Sivelrman y Simon; 1974). Recientemente se ha descrito que, de forma similar a *E.coli* y *Salmonella* spp., en *Serratia marcescens* la regulación de la producción del flagelo es a través de un sistema de represión catabólica (Stella y col., 2008). La proteína CRP se une a AMPc que ha sido sintetizado por *cyaA* (codifica la adenilato ciclasa CyaA) como consecuencia de variaciones en las fuentes de carbono ambientales. En este trabajo, determinan que cepas con alteraciones en *crp* y *cyaA*, suprimen la síntesis del flagelo. Pero basta con la adición de AMPc externo en el caso del mutante *cyaA*, o con la sobreexpresión de *flhDC* en el mutante *crp*, para que ambos



restauren la movilidad. Estos estudios concluyen demostrando como el sistema de represión catabólica regula a *flhDC*. Con estos antecedentes, construimos mutantes *cyaA* y *vfr* (homólogo a CRP de *E.coli*), y dobles mutantes *kinBcyaA* y *kinBvfr*. Los mutantes simples presentaron niveles de movilidad similares a los de F113 (Fig. 4.6). Pero las mutaciones de estos genes en un fondo genético *kinB* suprimen el fenotipo hiper móvil de este mutante (Fig. 4.6), lo que sugiere que *vfr* y *cyaA* activan *flhDC*, pero a su vez se encontrarían controlados negativamente por KinB (Fig. 4.11), tal y como se ha mostrado en *P. aeruginosa* para el control de factores de virulencia (Jones y col., 2010).



**Fig. 4.11:** Modelo de la posible regulación del segundo aparato flagelar en *P. fluorescens* F113. El factor sigma AlgU o  $\sigma^{22}$ , activa KinB, que a su vez regula negativamente la transcripción de *vfr*. Cuando *kinB* está mutado, se sintetiza Vfr que puede unir el AMPc producido por Cya. El complejo Vfr-AMPc regularía positivamente al máster regulador principal *flhDC*.

Las imágenes de microscopía nos muestran que la cepas que expresan el segundo aparato flagelar, F113(*pflhDC*), el mutante *kinB* y el variante fenotípico S, presentan en todos los casos, flagelos más numerosos y más largos, pero siempre en posición polar (Fig. 4.7). En especies de Enterobacterias con flagelación peritrica, los mismos flagelos son responsables de la movilidad tipo *swimming* y *swarming* (Fraser y Hughes, 1999; Rhater, 2005). Otras bacterias presentan dos grupos de genes que van a codificar para flagelos polares o peritricos, respectivamente, cada uno de los cuales estará implicado en *swimming* y *swarming* (McCarter, 2006; Moens y col., 1996). Y también existe el caso, como ocurre en nuestra cepa de estudio, que ambos flagelos producidos tienen posiciones polares en la célula (Poggio y col., 2007). En general, se relaciona la regulación de flagelos mediante *flhDC* con flagelación peritrica y la regulación a través de *fleQ*, con flagelación polar. Sin embargo, se ha descrito la regulación de los flagelos polares de *Burkholderia glumae* por *flhDC* (Kim y col, 2007). Nuestros resultados y éstos demuestran que la regulación por *flhDC* no implica flagelación peritrica. Además, podemos afirmar que la hiperflagelación se debe a la expresión del segundo aparato flagelar y

no del primero, ya que en un mutante *kinB* no se detectan mayores niveles de FliC del primer flagelo que en la cepa silvestre. De hecho, estos niveles son inferiores a los del mutante hipermóvil *sadB*, del cual sabemos que su movilidad se debe a la sobreexpresión de FleQ (Fig. 4.8) (Navazo y col., 2009).

Por último, queríamos conocer si este nuevo aparato flagelar tenía algún papel relevante en la colonización de la rizosfera, ya que la movilidad se ha descrito como un carácter importante en este proceso (Achouak y col., 2004; Barahona y col., 2010; Barahona y col., 2011; Capdevila y col., 2004; Chin-A-Woeng y col., 2000; Dekkers y col., 1998; de Weger y col., 1987; Kamilova y col., 2005; Martínez-Granero y col., 2006; Simons y col., 1996). En primer lugar se cuantificó la expresión de la flagelina *fliC2* en colonizadores competentes aislados de la rizosfera tras inocular en la raíz la cepa silvestre sobreexpresando la recombinasa específica de sitio Sss (Martínez-Granero y col., 2006). Todos estos variantes fenotípicos hipermóviles expresaban FliC2 (Fig.4.9), indicando que en el ecosistema de la rizosfera, se selecciona la producción del segundo aparato flagelar. En segundo lugar, decidimos analizar la capacidad competitiva entre cepas que expresan el segundo flagelo frente a otras que no lo hacen. En la figura 4.10, se observa como la cepa silvestre desplaza de la rizosfera al mutante *fliC2*, que nunca expresa el segundo flagelo, lo que de nuevo indica que éste se expresa en este ambiente. En la misma línea, un mutante *kinB*, que presenta ambos flagelos funcionales, desplaza contundentemente al doble mutante *kinBfliC2*, que sólo expresa el primer flagelo.

En resumen, podemos concluir que *P. fluorescens* F113 presenta un segundo aparato flagelar similar al de *A. vinelandii* DJ, cuya regulación es muy parecida a la de Enterobacterias, es decir, dependiente de AMPc. Además, parece ser que la bacteria necesita que el primer flagelo este presente para que tenga lugar la biogénesis del segundo. La producción de este segundo flagelo parece jugar un papel fundamental en el proceso de colonización de la rizosfera.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aarons S., Abbas A., Adams C., Fenton A., y O’Gara F. (2000). A regulatory RNA (Prrb RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* **182**: 3913-3919.
- Achouak W., Conrod, S., Cohen V., y Heulin T. (2004). Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root-colonization strategy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**: 872-879.
- Adler J., y Templeton B. (1967). The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli*. *J. Gen Microbiol.* **46**: 175-184.
- Akerley B.J., Cotter P.A., y Miller J.F. (1995.) Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell.* **80**: 611-620.
- Aldridge P., y Hughes K.T. (2002). Regulation of flagellar assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 160-165.
- Apel D., y Surette M.G. (2008). Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**: 1851-1858.
- Arora S.K., Ritchings B.W., Almira E.C., Lory S., y Ramphal R. (1997). A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J. Bacteriol.* **179**: 5574-5581.
- Barahona E., Navazo A., Yousef-Coronado F., Aguirre de Cárcer D., Martínez-Granero F., Espinosa-Urgel M., Martín M., y Rivilla R. (2010). Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environ. Microbiol.* **12**: 3185-3195.
- Barahona E., Navazo A., Martínez-Granero F., Zea-Bonilla T., Pérez-Jiménez R.M., Martín M., y Rivilla R. (2011). A *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability shows improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* In press.
- Beatson S.A., Whitchurch C.B., Sargent J.L, Levesque R.C., y Mattick J.S. (2002). Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **184**: 3605–3613.
- Botsford J.L., y Harman J.G. (1992). Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **56**: 100-122.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Caiazza N.C., y O’Toole G.A. (2004). SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* **186**: 4476-4485.
- Capdevila S., Martínez-Granero F., Sánchez-Contreras M., Rivilla R., y Martín M. (2004). Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiol.* **150**: 3889-3897.
- Chadsey M.S., Karlinsey J.E., y Hughes K.T. (1998). The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium* sigma28 RNA polymerase holoenzyme. *Genes Dev.* **12**: 3123-3136.
- Chand N.S., Lee J.S., Clatworthy A.E., Golas A.J., Smith R.S. y Hung D.T. (2011). The sensor kinase KinB regulates virulence in acute *Pseudomonas aeruginosa* infection . *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.01546-10.

- Chatterjee A., Cui Y.Y., Yang H.L., Collmer A., Alfano J.R., y Chatterjee A.K.** (2003). GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 1106-1117.
- Chilcott G.S., y Hughes K.T.** (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 694-708.
- Chin-A-Woeng T.F., Bloemberg G.V., Mulders I.H., Dekkers L.C., y Lugtenberg B.J.** (2000). Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1340-1345.
- Choy W.K., Zhou L., Syn C.K., Zhang L.H., y Swarup S.** (2004). MorA defines a new class of regulators affecting flagellar development and biofilm formation in diverse *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* **186**: 7221-7228.
- Damron F.H., Qiu D., y Yu H.D.** (2009). The *Pseudomonas aeruginosa* sensor kinase KinB negatively controls alginate production through AlgW-dependent MucA proteolysis. *J. Bacteriol.* **19**: 2285- 2295.
- Dasgupta N., y Ramphal R.** (2001). Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**: 6636-6644.
- Dasgupta N., Ferrell E.P., Kanack K.J., West S.E., y Ramphal R.** (2002). fleQ, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is sigma70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* **184**: 5240-5250.
- Dasgupta N., Wolfgang M.C., Goodman A.L., Arora S.K., Jyot J., Lory S., y Ramphal R.** (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **50**: 809-824.
- Dekkers L. C., Phoelich C.C., van der Fits, L. y Lugtenberg, B.J.J.** (1998). A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**: 7051-7056.
- Dekkers L.C., Mulders I.H.M., Phoelich C.C., Ching-A-Woeng T.F.C., Wijfjes A.H.M., y Lugtenberg B.J.J.** (2000). The *sss* colonization gene of the tomato *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. *Bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1177-1183.
- de Lorenzo V., Eltis L., Kessler B., y Timmis K.N.** (1993). Analysis of *Pseudomonas* gene products using lacIq/Ptrp-lac plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene.* **123**: 17-24.
- de Weert S., Vermeiren H., Mulders I.H., Kuiper I., Hendricks N., Bloemberg G.V., Vanderleyden J., de Mot R., y Lugtenberg B.J.** (2002). Flagella-driven chemotaxis towards exudates components is an important trait for tomato root colonization by *pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1173-1180.
- de Weger L.A., van der Vlugt C.I.M., Wijfjes A.H.M., Bakker P.A.H.M., Schippers B., y Lugtenberg B.** (1987). Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol* **169**: 2769-2773.

- Fahraeus G.** (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by simple glass technique. *J. Gen.* **16**: 374-381.
- Finan T.M., Kunkel B., De Vos G.F., y Signer E.R.** (1986). Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* **167**: 66–72.
- Fraser G.M., y Hughes C.** (1999). Swarming motility. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 630-635.
- Fulcher N.B., Holliday P.M., Klem E., Cann M. J., y Wolfgang M. C.** (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity. *Mol. Microbiol.* **76**: 889–904.
- Gaffney T.D., Lam S.T., Ligon J. y otros autores** (1994). Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. *Mol. Plant-Microbe. Interact.* **7**: 455-463.
- Gaona G., Nuñez C., Goldberg J.B., Linford A.N., Nájera, R., Castañeda M., Guzmán J., Espín G., y Soberón-Chávez G.** (2004). Characterization of the *Azotobacter vinelandii* *algC* gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**: 199–206.
- Garrett E.S., Perlegas D., y Wozniak D.J.** (1999). Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). *J. Bacteriol.* **181**: 7401-7404.
- Haas D., y Keel C.** (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**: 117-153.
- Heeb S., y Haas D.** (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol. Plant-Microbe. Interact.* **14**: 1351-1363.
- Heurlier K., Williams F., Heeb S., Dormond C., Pessi G., Singer D., Camar, M., Williams P., y Haas D.** (2004). Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/rsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **186**: 2936-2945.
- Hickman J.W., Tifrea D.F., y Harwood C.S.** (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 14422-14427.
- Hughes K.T., Gillen K.L., Semon M.J., y Karlinsey J.E.** (1993). Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science.* **262**: 1277-1280.
- Jones A.K., Fulcher N.B., Balzer G.J., Urbanowski M.L., Pritchett C.L., Schurr M.J., Yahr T.L., y Wolfgang M.C.** (2010). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgU regulon through mucA mutation inhibits cyclic AMP/Vfr signaling. *J. Bacteriol.* **192**: 5709-5717.
- Jyot J., Dasgupta N., y Ramphal R.** (2002). FleQ, the major flagellar gene regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to enhancer sites located either upstream or atypically downstream of the RpoN binding site. *J. Bacteriol.* **184**: 5251-5260.
- Kamilova F., Validov S., Azarova T., Mulders I., y Lugtenberg B.** (2005). Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ Microbiol* **7**: 1809-1817.
- Kay E., Dubuis C., y Haas D.** (2005). Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**: 17136-17141.

- Kim J., Kang Y., Choi O., Jeong Y., Jeong J.E., Lim J.Y., Kim M., Moon J.S., Suga H., y Hwang I. (2007). Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in *Burkholderia glumae*. *Mol. Microbiol.* **64**: 165-179.
- Kirchner O., y Tauch A. (2003). Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**: 287-299.
- Komeda Y., Suzuki H., Ishitsu I., y Iino T. (1975). The role of cAMP in flagellation of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **142**: 289-298.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- León R., y Espín G. (2008) *flhDC*, but not *fleQ*, regulates flagella biogenesis in *Azotobacter vinelandii*, and is under AlgU and CydR negative control. *Microbiol.* **154**: 1719-1728.
- Liu X., y Matsumura P. (1994). The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J. Bacteriol.* **176**: 7345-7351.
- Lugtenberg B.J.J. y Bloemberg G.V. (2004). Life in the rhizosphere. In *Pseudomonas*. Edited by J. L. Ramos. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Ma S., Wozniak D.J. y Ohman D.E. (1997). Identification of the histidine protein kinase KinB in *Pseudomonas aeruginosa* and its phosphorylation of the alginate regulator AlgB. *J. Biol. Chem.* **272**: 17952-17960.
- Macnab R.M. (1999). The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus. *J. Bacteriol.* **181**: 7149-7153.
- Macnab R.M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 77-100.
- Martínez-Granero F., Rivilla R., y Martín M. (2006). Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3429-3434.
- McCarter L.L. (2006). Regulation of flagella. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 180-186.
- Moens S., y Vanderleyden J. (1996). Functions of bacterial flagella. *Crit. Rev. Microbiol.* **22**: 67-100.
- Naseby D.C., y Lynch J.M. (1999). Effects of *Pseudomonas fluorescens* F113 on ecological functions in the pea rhizosphere are dependent on pH. *Microb. Ecol.* **37**: 248-256.
- Navazo A., Barahona E., Redondo-Nieto M., Martínez-Granero F., Rivilla R., y Martín M. (2009). Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microb. Biotechnol.* **2**: 489-498.
- Poggio S., Abreu-Goodger C., Fabela S., Osorio A., Dreyfus G., Vinuesa P., y Camarena L. (2007). A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **189**: 3208-3216.
- Quiñones B., Dulla G., y Lindow S. E. (2005). Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**: 682-693.
- Rather P.N. (2005). Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ. Microbiol.* **7**: 1065-1073.

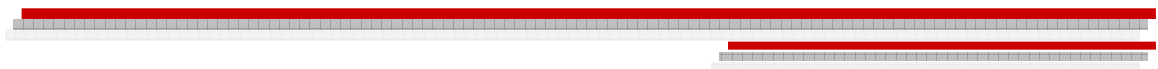
- Rediers H., Vanderleyden J., y De Mot R.** (2004). *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? *Microbiol.* **150**: 1117-1119.
- Sánchez-Contreras M., Martín M., Villaceros M., O’Gara F., Bonilla I., y Rivilla R.** (2002). Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* **184**: 1587-1596.
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., y Pühler A.** (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. **145**: 69-73.
- Scher F.M., y Baker R.** (1982). Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*. **72**: 1567-1573.
- Schmitt C.K., Darnell S.C., Tesh V.L., Stocker B.A., y O'Brien A.D.** (1994). Mutation of *flgM* attenuates virulence of *Salmonella typhimurium*, and mutation of *fliA* represses the attenuated phenotype. *J. Bacteriol.* **176**: 368-377.
- Shanahan P., O’Sullivan D.J., Simpson P., Glennon J.D., y O’Gara F.** (1992). Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 353-358.
- Silverman M., y Simon M.** (1974). Characterization of *Escherichia coli* flagellar mutants that are insensitive to catabolite repression. *J. Bacteriol.* **120**: 1196-1203.
- Simons M., van der Bij A.J., Brand I., de Weger L.A., Wijffelman C.A., y Lugtenberg B.J.J.** (1996). Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 600-607.
- Soutourina O., Kolb A., Krin E., Laurent-Winter C., Rimsky S., Danchin A., y Bertin P.** (1999). Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J. Bacteriol.* **181**: 7500-7508.
- Stella N.A., Kalivoda E.J., O'Dee D.M., Nau G.J., y Shanks R.M.** (2008). Catabolite repression control of flagellum production by *Serratia marcescens*. *Res. Microbiol.* **159**: 562-568.
- Tart A.H., Wolfgang M.C., y Wozniak D.J.** (2005). The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of *fleQ*. *J. Bacteriol.* **187**: 7955-7962.
- Tart A.H., Blanks M. J., y Wosniak D.J.** (2006). The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *J. Bacteriol.* **188**: 6483-6489.
- Thormann K.M., y Paulick A.** (2010). Tuning the flagellar motor. *Microbiol.* **156**: 1275-1283.
- Tomenius H., Pernestig A.K., Jonas K., Georgellis D., Mollby R., Normark S., y Melefors, O.** (2006). The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is a virulence determinant in the urinary tract. *BMC Microbiol.* **6**: 27.
- Villaceros M., Power B., Sánchez-Contreras M., Lloret J., Oruezabal R.I., Martín M., Fernández-Piñas F., Bonilla I., Whelan C., Dowling D.N., y Rivilla R.** (2003). Colonization behaviour of *Pseudomonas*

*fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. *Plant Soil*. **251**: 47-54.

- Villacieros M., Whelan C., Mackova M., Molgaard J., Sánchez-Contreras M., Lloret J., Aguirre de Cárcer D., Oruezábal R.I., Bolaños L., Macek T., Karlson U., Dowling D.N., Martín M., y Rivilla R.** (2005). Polychlorinated biphenyl rhizoremediation by *Pseudomonas fluorescens* F113 derivatives, using a *Sinorhizobium meliloti* nod system to drive bph gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2687-2694.
- West S.E., Sample A.K., y Runyen-Janecky L. J.** (1994). The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J. Bacteriol.* **176**: 7532–7542.



## MATERIAL SUPLEMENTARIO





Este material suplementario corresponde a estudios muy preliminares sobre la comparativa entre el transcriptoma y proteoma de *P.fluorescens* F113 y el triple mutante hipermóvil KSW, excelente colonizador de la rizosfera y con mejores capacidades de control biológico. Para llevar a cabo este cometido, se utilizaron técnicas de hibridación substractiva de ADNc y electroforesis de proteínas bidimensionales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.**

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio han sido anteriormente descritas: *P. fluorescens* F113 (Shanahan y col., 1992) y el triple mutante hipermóvil KSW, que porta mutaciones en los genes *kinB*, *sadB* y *wspR* (Barahona y col., 2011).

Las cepas de *Pseudomonas* se cultivaron en medio SA (Sacarosa-Asparragina) (Scher y Baker, 1982) (Tabla 2.1) con agar purificado al 1.5% (Pronadisa, España), suplementado con  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Las condiciones de crecimiento fueron 16 horas a 28°C. Para los cultivos líquidos, las bacterias fueron crecidas, tanto en SA como en medio LB (Tabla 2.1) en agitación a 28°C durante 16 horas.

Para la selección de cepas se utilizaron las siguientes concentraciones de antibiótico: rifampicina, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; espectinomicina, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; kanamicina, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y gentamicina, 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **Hibridación substractiva.**

#### **Extracción, purificación y cuantificación de ARN.**

Para la extracción de ARN, ambas cepas, *P.fluorescens* F113 y KSW, se crecieron en 40 mL de LB hasta densidades ópticas que oscilaron entre 0.8 y 0.9. A continuación, los cultivos bacterianos se centrifugaron 5 min a 5000 rpm y a 4°C. El precipitado celular se resuspendió en 1mL de TRIzol (TRIzol® Reagent, Invitrogen) para su lisis. Luego, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se agitaron los tubos vigorosamente, para después dejar reposar la mezcla 3 min. Las muestras fueron centrifugadas durante 15 min a 12000 rpm y a 4°C. Una vez centrifugadas, se recuperó en un nuevo tubo la fase superior líquida, donde se queda retenido todo el ARN. La precipitación de ARN tuvo lugar a -20°C con 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol, durante 2-24 horas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 10 min a 12000 rpm y a 4°C, se eliminó el

sobrenadante y el precipitado se lavó con 1mL de etanol 70%. De nuevo, se centrifugaron los tubos 5 min a 7500 rpm y a 4°C, se retiró el etanol y se dejaron secar 3 min a temperatura ambiente, para a continuación resuspender el ARN en 50 µL de H<sub>2</sub>O miliQ estéril. Los valores de concentración de ARN obtenidos en el espectrofotómetro, oscilaron entre 1.7 y 2 µg/µL.

Después de la extracción, realizamos un tratamiento de eliminación de restos de ADN con el kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega). Se trataron un total de 25 µg de ARN, a los que se añadieron 25 µL de DNasa (1U/µL), 6.25 µL de RNase *out* (40U/µL, Invitrogen), 12.5 µL de *buffer* ADNsa (10X) y H<sub>2</sub>O hasta 125 µL. Las muestras se incubaron a 37°C durante 30 min. Una vez finalizado el tratamiento, el ARN se purificó utilizando de nuevo el protocolo del TRIzol, pero al final se resupendió en 10 µL. Al valorar el material, las concentraciones de ARN obtenido fueron de aproximadamente 1.9 µg/µL. Para asegurarnos de la eliminación del ADN, se realizaron PCRs del material, y para comprobar que el ARN no estaba degradado se corrieron las muestras en una electroforesis en gel de agarosa.

#### ***Síntesis de ADNc (ADN de cadena sencilla) y de ADNdc (ADN de doble cadena).***

Una vez extraído el ARN de ambas cepas se procedió a realizar la síntesis de ADNc, siguiendo una parte del protocolo de Affymetrix (GeneChip Double-Stranded Target Assay). Se utilizaron 7 µg de ARN a los que se añadió 1µL de Random primer (3 µg/ µL) y H<sub>2</sub>O hasta 8 µL. Este primer *mix* fue sometido a 70°C- 5 min; 25°C- 5 min y 4°C- 5min. Una vez concluidos los ciclos, al primer *mix* se le añadió un segundo *mix* que contenía 4 µL de *strand buffer* (5X), 2 µL de DTT 0.1 M, 1 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de RNase *out* (40U/µL) y 4 µL de la enzima Superscript II (200U/µL); y tuvo lugar la transcripción inversa mediante el siguiente programa: 25°C- 10 min; 42°C- 90 min; 70 °C- 10 min y 4°C- ∞. A continuación, se preparó un segundo *mix*, compuesto por 8 µL de MgCl<sub>2</sub> 17.5 mM; 1 µL de dNTPs 10 mM; 1 µL de ADN pol I (10U/µL); 0.5 µL de RNase H (2U/µL) y 9.3 µL de H<sub>2</sub>O. Esta nueva mezcla se añadió a los 20 µL de la primera reacción y se procedió a la síntesis de ADNdc mediante el siguiente programa: 16°C-2 horas; 75°C-10 min; 4°C- ∞. El ADNdc se purificó utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

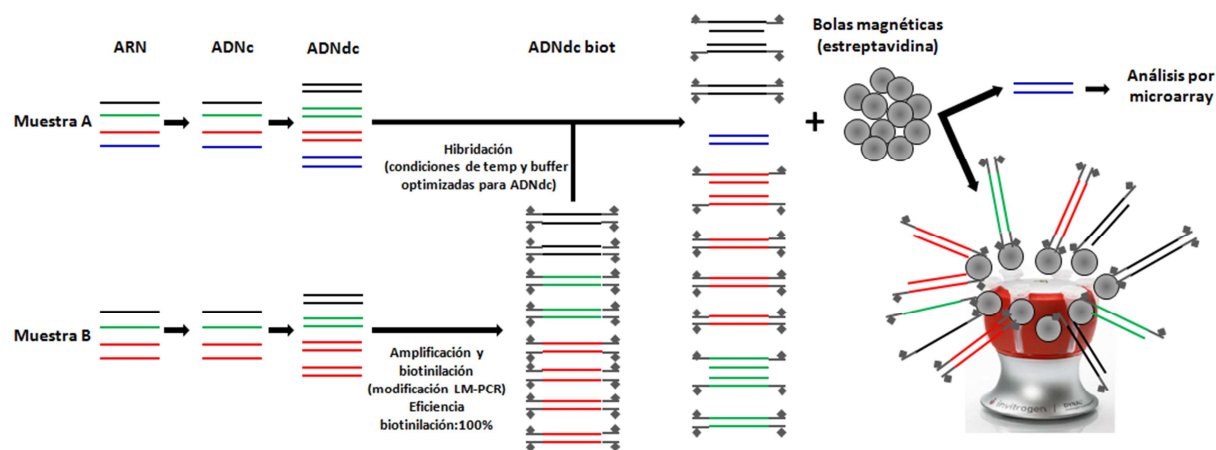
#### ***Biotinilación de ADNdc.***

Para la biotinilización del ADNc se siguió el protocolo de LM-PCR (Lee y col., 2006). Para la ligación se usaron los oligonucleótidos LM-PCR F y R, y para la amplificación se utilizó

LM-PCR F previamente biotinilado y purificado por HPLC. El ADNdc biotinilado se purificó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

### **Substracción.**

Se utilizaron aproximadamente 200 ng del ADN problema por cada 5 µg del ADNdc biotinilado, a lo que se añadió H<sub>2</sub>O hasta 50 µL, y 50 µL del tampón B&W 2x (TrisHCl 10 mM pH 7.5; EDTA 1 mM y NaCl 2 M). Esta mezcla se hibridó en el termociclador con las siguientes condiciones: 95°C- 10 min; hielo- 5 min y 65°C- 20 horas. Tras el paso de hibridación, se procedió al lavado de 50 µL de bolas magnéticas MyOne Streptavidin C1 (Invitrogen) con 500 µL de tampón B&W 1x, tres veces. Una vez lavadas, se retiró todo el líquido y se añadió 100 µL de B&W 1x y los 100 µL de la mezcla de hibridación y se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Una vez eliminadas las bolas magnéticas se repitió el mismo proceso de incubación de 30 min con otros 50 µL de bolas magnéticas para eliminar los posibles restos de ADN biotinilado. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante (200 µL) dónde estaba el ADN (no sustraído) y se purificó precipitándolo con glicógeno y etanol 100%. Las rondas de substracción se repitieron 3 veces hasta conseguir la mayor eliminación del ADN común (Fig. S1).



**Fig. S1:** Esquema de la técnica de hibridación substractiva.

### **Amplificación del ADN específico, clonaje y secuenciación.**

El ADN específico obtenido se amplificó con el kit GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification (Sigma), para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante. Tras la PCR, el ADN amplificado se purificó para posteriormente clonarlo en el vector de clonaje

pGEM®T-easy vector (Promega). De las colonias resultado de la transformación, se extrajo el plásmido recombinante usando el kit Wizard® Plus SV Minipreps (Promega). Por último, se secuenciaron un total de 131 clones en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid-UCM (<http://www.ucm.es/info/gyp/genomica/>).

### **Electroforesis bidimensional de proteínas (2D).**

#### ***Extracción de proteínas totales.***

Para la extracción de proteínas totales, las cepas bacterianas se crecieron en medio LB hasta llegar a una  $DO_{600}$  de 0.9. A continuación, se centrifugaron los cultivos a 7500 rpm durante 15 min a 4°C. Los precipitados celulares se resuspendieron en 3 mL de tampón fosfato (PBS), junto con 20 mM de DTT y 50 µL de un cóctel de inhibidores de proteasas (Proteasa Inhibitor Cocktail tablets, Roche) por cada mililitro de volumen. Las muestras se repartieron en tubos eppendorf para proceder a la sonicación de las mismas. El sonicador utilizado fue Bioruptor™ UCD-200 (Diagenode), instalado en un cámara fría. Se sonicaron las células a máxima potencia (potencia H= 320 W), durante 15 min con pulsos de 30 segundos ON/30 segundos OFF. Una vez se lisaron las células, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm y 4°C durante 15 min para eliminar todos los restos celulares. Los sobrenadantes con las proteínas extraídas se alicuotaron y se almacenaron a -80°C.

#### ***Valoración y precipitación de proteínas.***

Antes de proceder a las electroforesis, las proteínas se cuantificaron mediante el método de Micro-Bradford (Bio-rad Protein Assay) (Bradford, 1976). Los valores obtenidos oscilaron entre 3 y 5.5 µg/µL. Posteriormente se precipitaron 150 µg de proteínas con el siguiente procedimiento: se añadió ácido desoxicólico (DOC) 0.15% para una dilución final 1:10 con la muestra proteica, y posteriormente se agitó. Tras 10 minutos a temperatura ambiente se añadió ácido tricloroacético (TCA) 72% para una dilución 1:10 final con la muestra proteica. Se incubaron las muestras durante 2 horas en hielo y se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Tras descartar el sobrenadante, se añadieron 300 µL de acetona 80% (previamente pre-enfriada a -20°C) y se dejaron en hielo durante 20 minutos a 4°C para lavar las muestras. Por último, se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Tras descartar de nuevo el sobrenadante, se dejó secar el sedimento, y se guardaron las muestras a -20°C.

**Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (IPGphor, Ettan Dalt6).**

Con el objetivo de encontrar diferencias entre el proteoma de *P.fluorescens* F113 y KSW, se realizaron electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2-D PAGE). Los pasos que se siguieron, se detallan a continuación.

En primer lugar, se rehidrató la tira o “*strip*” (Immobiline Drystrip) donde tuvo lugar la separación de las proteínas según su punto isoelectrico. Para ello, se añadió al tampón de rehidratación (Tabla S1) 30 µL de DeStreak Reagent (GE Healthcare), para evitar la oxidación inespecífica de los grupos tioles, e IPG Buffer (específico para cada gradiente de pH) (Amersham, Life Science). Las tiras utilizadas fueron siempre de 7 cm, pero variaron en función del pH, que en un caso fue de 4 a 7, y en otro de 3 a 5. Para rehidratar la tira, se añadieron 125 µL del tampón de rehidratación con IPG Buffer en el carril del soporte, donde se colocó la cara de la tira con el gel en contacto con el tampón de rehidratación. Una vez colocada la tira sobre el carril, se añadió aceite (PlusOne, DryStrip Cover Fluid, Amersham, Life Science) para evitar el contacto del gel con el aire, lo que impediría su correcta rehidratación. El tiempo ideal de rehidratación fue de 13 horas con un máximo de 16, a temperatura ambiente. Así mismo, las muestras proteicas precipitadas se rehidrataron con un volumen de 150 µL del tampón de rehidratación para lograr una concentración proteica final aproximada de 1 µg/µL. Las muestras se incubaron a 4°C hasta el momento de su carga.

**Tabla S1:** Composición del tampón de rehidratación.

Componentes	Cantidad
Urea	12 g
3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato (CHAPS)	0.5 g
Azul de bromofenol 5%	0.007 g (por cada 2.5 mL de tampón)
DeStreak Reagent	30 µL por cada 2.5 mL de tampón
IPG <i>buffer</i>	0.5% (12.5 µL por cada 2.5 mL de tampón)
H <sub>2</sub> O	Hasta 25 mL

Para la primera dimensión, se utilizó el aparato Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) en el que se colocó la placa de cerámica o manifold equilibrado. Se recogió la tira del soporte de rehidratación y se colocó con el gel orientado hacia arriba y de acuerdo con la posición del ánodo y el cátodo. Se cubrió el manifold con aceite y se colocaron los electrodos. Una vez cargadas las proteínas, se seleccionó el programa para correr la muestra en el software del

aparato, que constó de 4 pasos: paso 1: 300 V -0:30 horas; paso 2: 1000 V -1 hora; paso 3: 8000 V -2 horas; paso 4: 8000 V -4 horas. La intensidad de corriente durante todo el proceso fue constante con un valor aproximado de 50  $\mu$ A. Finalmente, se almacenaron las tiras a -20°C.

Para la segunda dimensión, se equilibraron las tiras previamente descongeladas utilizando 5 mL de tampón de equilibrado (Tabla S2). Se incubaron en agitación durante 15 minutos. A continuación, se añadió yodo acetamida (IAA) a otros 5 mL de tampón de equilibrado con el objetivo de alquilar al DTT y a las proteínas. Se dejó en agitación durante 15 minutos. Simultáneamente al equilibrado de las tiras, se preparó el gel de separación de poliacrilamida (12% (p/v)). Una vez solidificado se colocó la tira equilibrada de tal forma que quedara en contacto con el gel. Los marcadores de peso molecular de proteínas (BIO-RAD Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range) se cargaron a un lado de la tira impregnando 5  $\mu$ L de los mismos en un trozo de papel Whatman 3MM. Finalmente se añadió agarosa 0.5% con azul de bromofenol 0.001% precalentada a 95°C. Las muestras se resolvieron en el gel de poliacrilamida a intensidad constante de 15 mA y más adelante, de 30 mA por gel.

**Tabla S2:** Composición de la solución de equilibrado.

Componentes	Cantidad
Urea	72.1 g
Glicerol 87%	69 mL
Tris-HCl 75 mM pH 8.8	10 mL
SDS (dodecil sulfato sódico) 10%	40 mL
Azul de bromofenol 5%	10 $\mu$ L
Ditiotreitol (DTT)	0.1 g por cada 5 mL de tampón de equilibrado (añadir en fresco)
Yodo acetamida (IAA)	125 mg por cada 5 mL de tampón de equilibrado (añadir en fresco).
H <sub>2</sub> O	Hasta 200 mL

La tinción de los geles se hizo con azul *hot coomassie* (PhastGel™ Blue R, GE Healthcare), ya que es una tinción compatible con el análisis por espectrometría de masas. Primero se fijaron los geles (40% de etanol 100% y 10% de ácido acético glacial) durante 30 minutos. Posteriormente se tiñeron 10 min con 25 mL de una solución de azul *hot coomassie* hirviendo (se disolvió una pastilla en 1.6 L de ácido acético glacial al 10% y luego se filtró), y por último se destiñeron hasta ver claramente los puntos o *spots* con una solución de ácido acético glacial (10%).



***Espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight).***

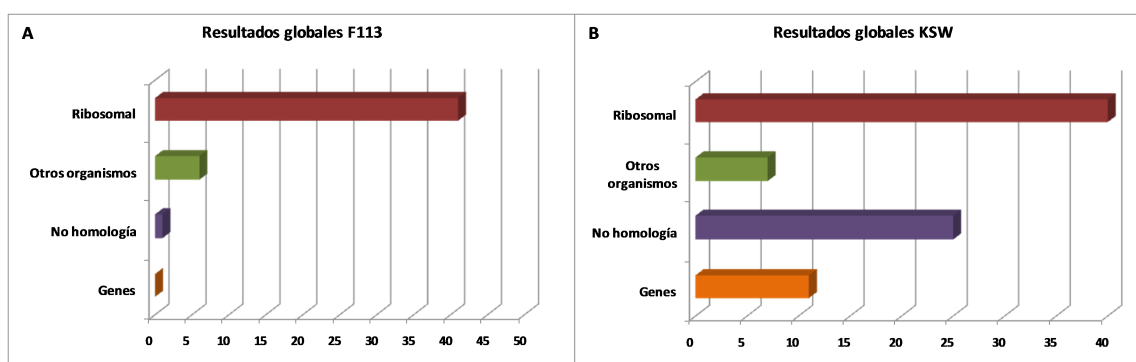
El análisis de las muestras proteicas por espectrometría de masas MALDI-TOF, fue realizado por la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid (<http://www.ucm.es/info/gyp/proteomica/>). Esta técnica analítica consiste en la ionización de las muestras proteicas que se encuentran embebidas en una matriz sólida orgánica. Tras la digestión con tripsina, se irradia la muestra con un láser pulsado (láser de nitrógeno) que ioniza la muestra digerida y en el analizador de tiempo de vuelo (TOF) los iones se separan en función de su masa y carga tras su aceleración en el vacío por un campo eléctrico. El tiempo que tardan en recorrer el analizador viene determinado por esos dos parámetros. El resultado de la espectrometría es un mapa o huella peptídica. La base de datos utilizada para la identificación proteica fue Mascot (<http://www.matrixscience.com>). Otros factores que se tuvieron en cuenta en la identificación proteica fueron: el número de péptidos identificados por cada proteína (un mayor número da más fiabilidad respecto a aquellas en las que sólo se identifica un péptido con alta masa molecular teniendo en cuenta su cobertura de secuencia), la existencia de contaminaciones y alteraciones proteicas como degradaciones parciales.

**RESULTADOS****Identificación de genes que se expresan diferencialmente en el triple mutante hipermóvil KSW .**

En la actualidad no disponemos de *microarrays* de expresión de *P. fluorescens* F113, por lo que el estudio de las diferencias entre los transcriptomas de F113 y el mutante KSW se realizó mediante hibridación substractiva de ADNc. Esta técnica permite el análisis de genes expresados de manera diferencial entre dos poblaciones de ARN: *tester* o muestra problema y *driver* o muestra de referencia. Se obtuvo ADNc y subsecuentemente ADNdc a partir de ambas poblaciones de ARN. Posteriormente el ADNdc de la muestra de referencia (cepa silvestre) fue biotinilado y un exceso de dicho ADNdc se hibridó con el ADNdc problema (ADNdc de KSW). Así, los complementarios formaron híbridos *tester-driver*-biotinilados y aquellos ADNdc expresados de manera diferencial en la muestra problema no hibridaron. La eliminación de los híbridos biotinilados se llevó a cabo mediante el uso de bolas magnéticas con estreptavidina y finalmente los ADNdc específicos fueron clonados y secuenciados. Este procedimiento se hizo

también a la inversa, para una posible detección de genes que sí se estuvieran expresando en F113 y no en el mutante KSW.

El total de clones secuenciados fue de 48 en el caso de *P. fluorescens*, y de 83 en el del triple mutante KSW. Aunque se realizaron varias rondas de substracción con el objetivo de descartar el ARNr, que supone más de un 90% del ARN de una bacteria, la mayor parte de los clones secuenciados de F113 y KSW se correspondieron con ARNr 23S y 16S, siendo 41 (85.4%) y 38 (45.8%), respectivamente (Figura S2A y B). Otras secuencias fueron problemáticas a la hora de la secuenciación. El número de clones de este tipo fue de 6 (12.5%) para la cepa silvestre y de 23 (27.7%) para el triple mutante KSW (Figura S2A y B). Además, un 2% de los clones (1 clon) en el caso de F113 y un 7.2% (6 clones) en el caso de KSW no presentaron homología con nuestra cepa de estudio ni con bacterias del mismo género, pero sí resultaron ser genes presentes en otras especies (Figura S2A y B). Y por último, obtuvimos clones que portaban genes que presentaban alta homología con otras *Pseudomonas*, pero únicamente pertenecientes al triple mutante KSW (11 clones, 13.3%) (Figura S2B).



**Fig. S2:** Resultados globales de la hibridación subtractiva tras la secuenciación. **A.** Resultados globales para la cepa silvestre: 41 clones fueron ARNr, 6 pertenecieron a otros organismos distintos a *Pseudomonas*, y tampoco estaban en F113, y 1 no presentó homología con nada. **B.** Resultados globales para el mutante KSW: 38 clones fueron ARNr, 6 pertenecieron a otros organismos distintos a *Pseudomonas*, y tampoco estaban en F113, 23 no presentaron homología con nada, y 11 clones tenían alta homología con especies de *Pseudomonas*.

Estos 11 clones se analizaron detalladamente por homología de secuencia mediante alineamientos utilizando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Además, la comprobación de que las secuencias pertenecían a nuestra cepa de estudio se realizó mediante alineamientos con la base de datos que contiene el genoma de *P. fluorescens* F113 que ha sido recientemente secuenciado por nuestro grupo. En la tabla S3 aparece un resumen del análisis de las secuencias. Para cada gen obtenido de KSW, se identificó la proteína codificada, así como el organismo con el que ésta presentaba una mayor homología.

También se muestra la medida de similitud entre secuencias (*score*), el número de acceso a la proteína en la base de datos del NCBI y el ORF correspondiente en F113.

**Tabla S3:** Clones secuenciados de la hibridación substractiva pertenecientes a KSW.

Clon	Proteína	Número acceso	Score	Organismo	Nº ORF F113
1	Precursor peptidoglicano GlmU	YP004354276.1	974	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	PSF113_5262
2	Poli A polimerasa (PcnB)	YP004356237.1	949	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	PSF113_4992
21	Flagelina (FliC2)	YP574036.1	383	<i>Chromohalobacter Salexigens</i> DSM	PSF113_0740
22	Posible adhesina	EGH62586.1	2274	<i>P. syringae</i>	PSF113_4466
27	Ligasa MurE	YP004356046.1	971	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	PSF113_4787
28	Nucleación de hielo (InaA)	YP261914.1	355	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	PSF113_4542
56	Chaperona ( <i>trigger factor</i> )	YP004353033.1	867	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	PSF113_3918
58	Posible cisteín- proteasa	YP004354087.1	645	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	PSF113_2621
68	Transportador ABC proteína periplásmica	YP004354844.1	1121	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	PSF113_2238
69	Enzima II del sistema fosfotransferasa	YP004351961.1	1043	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	PSF113_0887
70	Regulador transcripcional LysR	EGH67441.1	582	<i>P. syringae</i>	PSF113_4648

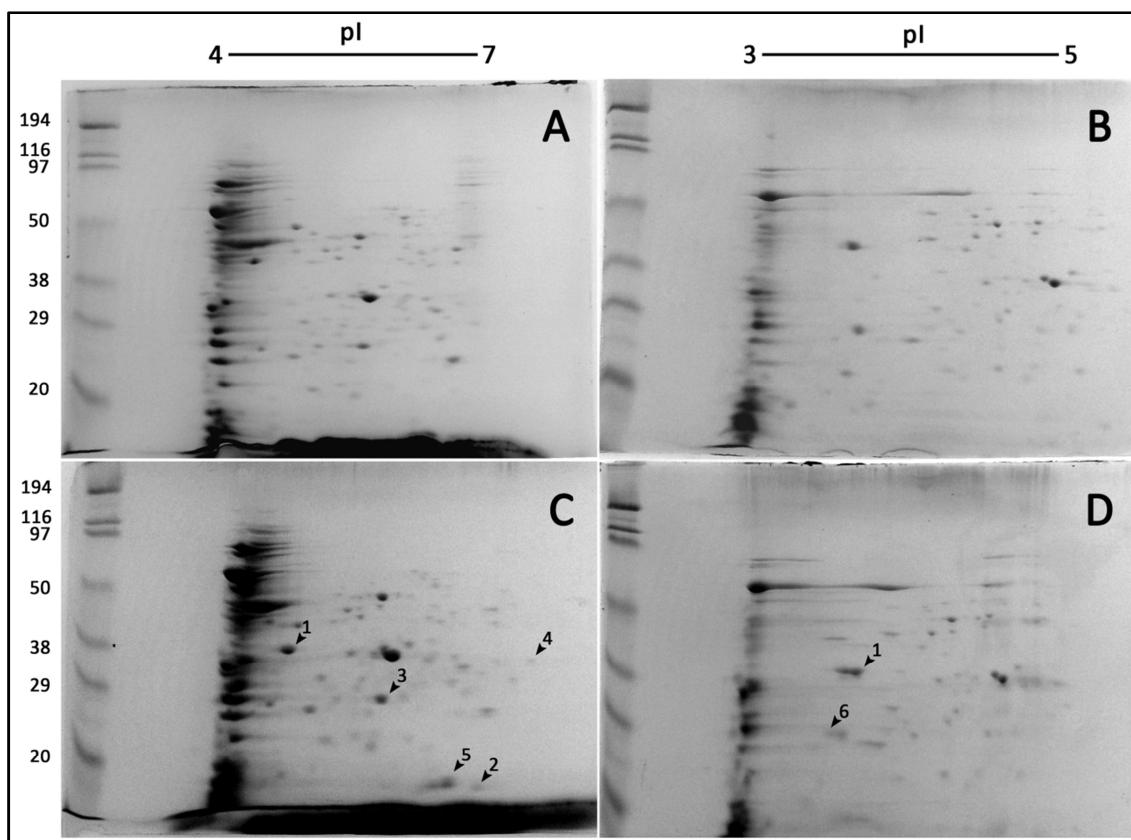
Los clones identificados se pueden clasificar en varios grupos. Por un lado, se han obtenido genes que codifican proteínas implicadas en la integridad de la membrana bacteriana. Dentro de éstas, las correspondientes a los clones 1 y 27, que son la proteína bifuncional GlmU (UDP-N-acetil-D-glucosamina o UDP/GlcNaC) y la ligasa dependiente de ATP MurE, respectivamente, están implicadas en la síntesis del peptidoglicano. También se ha identificado un gen que codifica una proteína periplásmica que forma parte de un transportador ABC (del inglés *ATP binding cassette*) en el clon número 68 (Tabla S3). Por otro lado, en un segundo apartado podríamos agrupar a dos genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo celular, que son una poli A polimerasa, anotada como PcnB (clon 2) y una enzima que forma parte de un sistema de fosfotranferasas (clon 69) (Tabla S3). El tercer grupo comprendería a genes que se han descrito como importantes en procesos de protección frente a estreses. Dentro de éstas, hemos identificado a InaA (del inglés *ice nucleaction active*, clon 28), que formaría parte de aquellas proteínas que catalizan la formación de cristales de hielo en el medio externo (Tabla S3). En el cuarto grupo, de proteínas reguladoras, incluiríamos al regulador transcripcional tipo LysR que se corresponde con el clon número 70 (Tabla S3). En un quinto grupo incluiríamos a un gen que codifica una chaperona (clon 56), anotada como *trigger factor*, implicada en la estabilización de péptidos que se están

sintetizando. Y por último, en el sexto grupo englobamos a genes que sintetizan proteínas que tienen que ver con procesos de colonización: la proteína estructural mayoritaria del filamento flagelar FliC (clon 21), una posible adhesina (clon 22), que forma parte de las proteínas implicadas en el anclaje a superficies mediante la interacción con carbohidratos, y por último, una proteína que forma parte de las cisteín-proteasas (clon 58), la cuales presentan actividad proteolítica y juegan un papel importante en la invasión del huésped (Tabla S3).

#### **Identificación de diferencias entre los proteomas de *P. fluorescens* F113 y del triple mutante KSW.**

Otro de los abordajes que permite estudiar en profundidad las diferencias de expresión génica entre dos o más especies bacterianas, es la técnica de electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2-D PAGE). Por este motivo hicimos uso de esta herramienta con el fin de detectar proteínas que se sobreexpresasen en el triple mutante KSW con respecto a F113. Las proteínas totales de ambas cepas fueron sometidas a una primera dimensión que permitió su separación en función de su punto isoelectrico (pI), para posteriormente poder resolverlas en geles de poliacridamida según su peso molecular.

En la figura S3 se muestran imágenes de los geles bidimensionales obtenidos. Para las dos cepas, F113 y KSW, se utilizaron tiras o *strips* con un pH de 4 a 7 (Figura S3A y C). Como consecuencia de que muchas proteínas quedaban en una franja de pH muy cercana a 4, y por tanto no se resolvían bien, decidimos hacer también el análisis con tiras de pH de un intervalo de 3 a 5 (Figuras S3B y D). Todos estos geles se estudiaron detalladamente con el fin de encontrar *spots* que estuvieran en una cepa y no en la otra, y viceversa. Las flechas indican 6 de los *spots* que fueron recortados y posteriormente analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF. Todas las proteínas encontradas como diferenciales correspondieron al triple mutante KSW (Figura S3 C y D).



**Fig. S3:** Geles bidimensionales de proteínas. La extracción de proteínas totales y los ensayos posteriores se realizaron por triplicado. **A.** Gel bidimensional de proteínas de F113 separadas en tiras de pH 4 a 7. **B.** Gel bidimensional de proteínas de F113 separadas en tiras de pH 3 a 5. **C.** Gel bidimensional de proteínas de KSW separadas en tiras de pH 4 a 7. **D.** Gel bidimensional de proteínas de KSW separadas en tiras de pH 3 a 5. Las flechas de **C** y **D** corresponden a los *spots* recortados y analizados. Los números indican el número de *spot* descrito en la tabla S4.

Los resultados de huella peptídica que se analizaron por Mascot, permitieron identificar la proteína. Se comprobó que aquellas proteínas con mayor *score* (puntuación dada de acuerdo con el algoritmo establecido por Mascot (Perkins y col., 1999)), correspondían a especies de *Pseudomonas*. Del mismo modo que para los ensayos de hibridación substractiva, en la tabla S4 se muestra la proteína identificada para cada *spot*, el número de acceso en la base de datos del NCBI, la especie con mayor homología, el pI, la masa nominal y el ORF correspondiente en F113.

**Tabla S4:** Proteínas de KSW identificadas por MALDI-TOF.

Spot	Acceso	Proteína identificada	Organismo	Masa nominal (Mr) kDa	Score	pI	Nº ORF F113
1	AAL57341.2	Flagelina (FliC)	<i>P. fluorescens</i>	29.229	540	4.74	PSF113_1554
2	YP004355547.1	Azurina	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	13.961	286	7.11	PSF113_0587
3	YP004355546.1	Succinil CoA ligasa	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	30.646	788	5.79	PSF113_4236
4	YP004356547.1	50S proteína ribosomal L1	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	24.236	459	9.50	PSF113_5305
5	YP004352105.1	Nucleósido difosfato quinasa	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	15.073	288	5.46	PSF113_1019
6	YP004353605.2	2,4- diacetilfloroglucinol (PhIA)	<i>P. brassicacearum</i> NFM421	34.537	727	4.75	PSF113_2462

Los *spots* 3 y 5 son proteínas implicadas en metabolismo de la célula bacteriana (Tabla S4), y más concretamente en el ciclo de Krebs. Por un lado, la succinil coenzima A ligasa (*spot* 3) se encarga de catalizar la reacción en la que a partir de succinil coA se obtiene succinato y coA. Esta reacción es muy exergónica, pero al contrario de lo que ocurre normalmente, no se obtiene ATP, sino GTP. Pero este GTP puede ser convertido a ATP mediante la nucleótido difosfato quinasa (*spot* 5). El *spot* 4 corresponde a una proteína ribosomal L1 (Tabla S4). Éstas son grandes proteínas que forman parte de la subunidad mayor del ribosoma. Los tres *spots* restantes (1, 2 y 6) son proteínas que de alguna manera están implicadas en procesos de colonización y biocontrol. De nuevo, con un abordaje distinto, detectamos la mayor expresión por parte del triple mutante de la flagelina FliC, hecho anteriormente descrito (Navazo y col., 2009) (Tabla S4). El *spot* número 2 ha sido identificado como la azurina, la cual forma parte de la cadena respiratoria y tiene función redox. Y en último lugar, el sexto *spot*, que es la proteína PhIA la cual participa en la biosíntesis del antibiótico DAPG (2,4- Diacetilfloroglucinol) (Tabla S4).

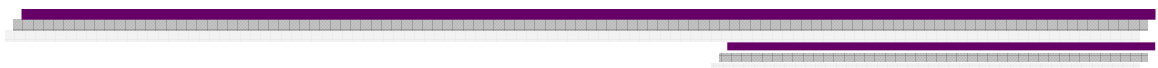
**BIBLIOGRAFÍA**

- Barahona E., Navazo A., Martínez-Granero F., Zea-Bonilla T., Pérez-Jiménez R.M., Martín M., y Rivilla R.** (2011). A *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability shows improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* In press.
- Bradford M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Lee T.I., Johnstone S.E., y Young R.A.** (2006). Chromatin immunoprecipitation and microarray-based analysis of protein location. *Nat. Protoc.* **1**: 729-748.
- Navazo A., Barahona E., Redondo-Nieto M., Martínez-Granero F., Rivilla R., y Martín M.** (2009). Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microb. Biotechnol.* **2**: 489–498.
- Scher F.M., y Baker R.** (1982). Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens. *Phytopathology.* **72**: 1567-1573.
- Shanahan P., O’Sullivan D.J., Simpson P., Glennon J.D., y O’Gara F.** (1992). Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 353-358.





## CONCLUSIONES





1. Las rutas de regulación definidas por el sistema GacAS, la proteína SadB, y el sistema Wsp, que de forma independiente reprimen la movilidad en *Pseudomonas fluorescens* F113, también están implicadas en los procesos de señalización relacionados con la formación de biopelículas. Los mutantes afectados en cualquiera de las tres rutas, muestran deficiencias en la formación de estas estructuras.
2. La formación de biopelículas no es un factor importante para la colonización de la rizosfera por parte de *P. fluorescens* F113. Los mutantes hipermóviles y variantes fenotípicos afectados en la formación de biopelículas, desplazan a la cepa silvestre en ensayos de colonización competitiva de la raíz. No existen diferencias en los patrones de colonización entre *P. fluorescens* F113 y el variante 35 hipermóvil y defectivo en la formación de biopelículas. En ambos casos, las bacterias se disponen formando estructuras tipo microcolonias sostenidas por un mucigel posiblemente de origen vegetal.
3. El gen *kinB* es otro represor de la movilidad tipo *swimming* en *P. fluorescens* F113, actuando a través de la misma ruta que el sistema de dos componentes GacAS.
4. La producción de metabolitos secundarios es el factor más importante en el control biológico de hongos fitopatógenos de raíz por *P. fluorescens* F113. Sin embargo, la mejora presentada por el triple mutante KSW, muestra que una mayor capacidad de colonización competitiva es importante para este biocontrol. Además, muestra que es factible el diseño racional de cepas mejoradas genéticamente para biocontrol.
5. *P. fluorescens* F113 contiene en su genoma genes que codifican un segundo aparato flagelar que presenta alta homología con el de *A. vinelandii* DJ. Este flagelo no se produce en condiciones normales de laboratorio y cuando se produce, está localizado en uno de los polos celulares.
6. La síntesis de este segundo flagelo está regulada positivamente a través de *cyaA* y *vfr* y negativamente por *kinB*. La producción del segundo flagelo por parte del mutante *kinB* explica su fenotipo de hipermovilidad. Es necesaria la síntesis del primer flagelo para la producción del segundo.

7. La producción del segundo flagelo es importante para la colonización competitiva de la rizosfera, ya que mutantes que no pueden producirlo, son desplazados por las cepas con capacidad de sintetizarlo.





